

**DIE WIRKUNG EINER
KOMBINIERTEN EMPFÄNGERBEHANDLUNG
AUF DEN CHIMÄRISMUS NACH
KNOCHENMARKTRANSPLANTATION**

Michael Aders

1976

AUS DEM INSTITUT FÜR HÄMATOLOGIE
DER GESELLSCHAFT FÜR STRAHLEN- UND UMWELTFORSCHUNG
NEUHERBERG
KOMMISSARISCHER DIREKTOR: PROF.DR.S.THIERFELDER

DIE WIRKUNG EINER KOMBINIERTEN EMPFÄNGERBEHANDLUNG AUF DEN
CHIMÄRISMUS NACH KNOCHENMARKTRANSPLANTATION



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs
Medizin
an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Michael Aders
aus München

München 1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof.Dr.S.Thierfelder

Mitberichterstatter: Prof.Dr.R.Marx

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.10.1976

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551907_0021

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	3
Material und Methoden	12
1. Tiere	12
2. Herstellung eines heterologen Antilympho- zytenserums	12
3. Herstellung eines heterologen Antitheta- serums	14
4. Bestrahlung	16
5. Knochenmarktransplantation	17
6. Beobachtung der Tiere nach Transplantation	18
7. Nachweis von Chimären	19
8. Statistische Auswertung	22
Versuchsaufbau	24
Fragestellung	27
Ergebnisse	28
1. Chimärismus	28
Versuchsreihe I (900 R bzw. ALS + 900 R)	28
Versuchsreihe II (800 R bzw. ALS + 800 R)	32
Versuchsreihe III (700 R bzw. ALS + 700 R)	36
Versuchsreihe IV (600 R bzw. ALS + 600 R)	41
Versuchsreihe V (500 R bzw. ALS + 500 R)	42

	Seite
2. Zustand nach Transplantation	43
Gewichtsverlauf und Mortalität bei Versuchsreihe I	45
Gewichtsverlauf und Mortalität bei Versuchsreihe II	47
Gewichtsverlauf und Mortalität bei Versuchsreihe III	50
3. Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse und statistische Beurteilung	52
Diskussion	56
I Immungenetik	57
II Immunantwort	60
III Immunsuppression	64
1. Thymektomie	65
2. Drainage des ductus thoracicus	68
3. Zytostatika	69
4. Corticosteroide	70
5. Ionisierende Strahlen	71
6. Antilymphozytenserum	73
7. Kombination von immunsuppressiven Maßnahmen	80
IV Unterdrückung der graft-versus-host-Reaktion	82
V Diskussion der eigenen Ergebnisse	85
Zusammenfassung	88
Literaturverzeichnis	91

Einleitung

Die erfolgreiche Übertragung von Knochenmark wurde in den letzten zehn Jahren von verschiedenen hämatologischen Zentren mitgeteilt. Hauptindikationen für die klinische Transplantation von Knochenmark sind kombinierte Immundefekte sowie aplastische Anämien, wie sie z.B. im Zusammenhang mit Zytostatikabehandlungen auftreten können. Seit kurzem wird die Übertragung hämopoetischer Zellen auch bei therapieresistenten Leukosen nach vorausgegangener Ganzkörperbestrahlung von ca. 1000 R erprobt. Durch eine derartige Vorbereitung des Patienten wird einmal im Knochenmarkstroma Platz für die Proliferation der Spenderzellen geschaffen, zum anderen werden durch ionisierende Strahlen maligne entartete Zellen vernichtet. Weitere mögliche Indikationen zur Knochenmarktransplantation könnten schwere hämolytische Anämien, hier insbesondere die Thalassämia major, sein. Große Bedeutung könnte die Knochenmarkübertragung für die Organtransplantation erlangen. Durch Transplantation hämopoetischer Zellen des Organspenders könnte der Empfänger gegenüber dem eigentlichen Transplantat tolerant gemacht werden. Eine Zusammenfassung der derzeitigen Indikationen sowie möglicher zukünftiger Indikationen für die Transplantation hämopoetischer Zellen gibt Speck (1).

Technisch stellt eine Knochenmarktransplantation heute kein Problem mehr dar. Die hämopoetischen Spenderzellen können nahezu risikolos aus Proliferationszentren des Spenders entnommen und als Zellsuspension dem Empfänger intravenös zugeführt werden (2).

Jedoch stehen der verhältnismäßig einfachen technischen Handhabung der Transplantation schwerlösliche immunologische Probleme - sowohl von seiten des Empfängers als auch von seiten des Transplantats - entgegen. Stößt der Empfänger homolog transplantierte Zellen ab, so spricht man von einer h.v.g.(host-versus-graft)-Reaktion, reagiert das Transplantat gegen den Empfänger von einer g.v.h.(graft-versus-host)-Reaktion. Ursache beider Reaktionen sind immunkompetente Zellen des Empfängers bzw. des Spenders, die zusammen mit dem Knochenmark übertragen werden.

Annäherung an die Lösung der klinischen Probleme der Knochenmarktransplantation schafft das Tiermodell, hier insbesondere Versuche an Mäusen, Ratten, Kaninchen, Hunden und Affen.

Den Versuch, einer durch ionisierende Strahlen hervorgerufenen Aplasie des Knochenmarks durch Transplantation von hämopoetischem Gewebe zu begegnen, beschrieb Chiari (3) 1912. Er transplantierte einem Kaninchen einen kleinen Knochenmarkbrocken aus dem Femur in die Milz und bestrahlte das Tier einige Wochen später mit

ionisierenden Strahlen unter Bleiabdeckung der Milz. Nach Monaten konnte Chiari eine Proliferation des transplantierten Gewebes beobachten. Homologe und heterologe Knochenmarktransplantationen blieben aber bis zum Beginn der 50er Jahre erfolglos.

Erst unter dem Eindruck der verheerenden Wirkung nuklearer Kriegswaffen begannen amerikanische Wissenschaftler mit der Erforschung der Folgen einer Ganzkörperbestrahlung mit ionisierenden Strahlen und deren Therapie (4).

1949 stellte Jacobson fest, daß Mäuse durch eine Bleiabdeckung der Milz vor den Folgen einer Knochenmarkaplasie, ausgelöst durch eine Ganzkörperbestrahlung von 600 R, bewahrt werden konnten (5), und daß ihre Überlebenszeit in demselben System nach Erhöhung der Strahlendosis erheblich gesteigert werden konnte (6).

Jacobson vermutete für die schnelle Kompensation des aplastischen Marks eine ektopische Blutbildung in der Milz der Tiere, für die schnelle Regeneration des Knochenmarks einen humoralen Faktor (7). 1951 gelang es Lorenz (8), mit seinen Versuchen einen Hinweis auf eine mögliche Zellmigration zu geben, indem er in Lebersinusoiden bestrahlter und homolog transplanteder Mäuse histologisch hämopoetisch proliferierende Zellen nachweisen konnte. Da nur bestrahlte erwachsene Mäuse keine derartigen hämopoetischen Zentren aufwiesen, vermutete Lorenz, daß Zellen der übertragenen Knochenmark-

suspension zu den ursprünglichen Zentren der Hämoopoese gewandert waren und dort zu proliferieren begannen. Barnes und Loutit (9,10) unterstützten auf Grund ihrer Versuche mit Mäusen die von Lorenz aufgestellte zelluläre Hypothese, während Cole (11) die von Jacobson postulierte humurale Hypothese für die Interpretation seiner Versuchsergebnisse verwendete. Im heterologen System gelang Vos (12) der eindeutige Beweis für die Migration transplantierte hämopoetischer Zellen in das Knochenmark des Empfängers. Für das homologe System konnten die Versuche Fords (13) als Beweis für eine Zellmigration angesehen werden. Die Spenderzellen konnten dabei leicht mikroskopisch identifiziert werden, da sich ihr Chromosomenbild deutlich von dem empfangereigener Zellen unterschied. Entscheidend war das sog. T6-Chromosom, das nur in den Spenderzellen zu finden war. Auf diese Weise konnten transplantierte Zellen nicht nur im Knochenmark, sondern auch in der Leber, in der Milz und im lymphatischen Gewebe gefunden werden. Ford erkannte bei seinen Versuchen bereits die Bedeutung der genetischen Kongruenz zwischen Empfänger und Spender, da er sich nicht wie Lorenz mit einer Überlebensrate der Tiere nach Transplantation von nur 20 bis 30 Tagen begnügte. Zu ähnlichen Ergebnissen war Vos (12) bei seinen Versuchen gelangt. Russel (14) führte nach Transplantation von isologem bzw. homologem Knochenmark Kontrollen des Blutbildes durch und beobachtete ebenfalls eine stärkere Toleranz der Empfänger gegen-

über dem Transplantat im isologen System. Trentin (15) konnte einen Zusammenhang zwischen dem Grad der genetischen Kongruenz von Spender- und Empfängertier und der Dauer des Schutzes letal bestrahlter Tiere durch Transplantation von isologem, homologem und heterologem Knochenmark zeigen. Als Anhaltspunkt diente ihm dabei - sowie in einer weiteren Arbeit im homologen System - einmal die Überlebenszeit der Tiere, zum anderen die Toleranz der Empfängertiere gegenüber einem Spenderhauttransplantat (16).

Die deutliche Verlängerung der Überlebenszeit letal bestrahlter Tiere nach Transplantation von isologem Knochenmark ermutigte schon Ende der 50er Jahre führende Kliniker, Knochenmarkübertragungen unter Zwillingen vorzunehmen; jedoch waren die Ergebnisse durchweg enttäuschend. Erst zu Beginn der 70er Jahre wurden in Amerika erneut Transplantationen von Knochenmark unter Zwillingen durchgeführt (17). Dabei ging der eigentlichen Transplantation eine Ganzkörperbestrahlung von 1000 R voraus.

Die Erfolge bei der syngenesischen Knochenmarktransplantation veranlaßten viele Wissenschaftler, nach Mitteln und Wegen zu suchen, die klinische Übertragung hämopoetischer Zellen auch auf Patienten mit nicht identischem Genmaterial auszudehnen. Grundlage für die Beherrschung dieses zweiten Schrittes stellt wiederum das Tiermodell dar. Die gewünschte Problematik läßt sich dank der intensiven

genetischen Untersuchungen der letzten Jahre in vielen Laboratorien und durch die zur Verfügung stehenden hochgradig ingezüchteten Mäusestämme nachvollziehen.

Tiere desselben Stammes tragen auf ihrer Zelloberfläche dieselben Antigene und können sich somit gegenseitig nicht als fremd erkennen; man spricht von einem histokompatiblen System. Tiere aus verschiedenen ingezüchteten Stämmen besitzen unterschiedliche Antigene auf ihren Zelloberflächen, die von den immunkompetenten Zellen des Empfängers und des Spenders erkannt werden und wechselseitige Reaktionen auslösen können. Werden in einem solchen System Transplantationen vorgenommen, spricht man von einem histoinkompatiblen System. Tiere aus gekreuzten Inzuchtstämmen, sog. F_1 -Hybride, können nicht gegen transplantierte Parentalzellen reagieren, da sie selbst die Antigene beider Elternteile auf ihren Zelloberflächen besitzen; dagegen reagiert das immunologische System der Eltern deutlich gegen Zellen der F_1 -Tiere.

Die Abstoßung histoinkompatiblen Gewebes durch den Transplantatempfänger als eine Folge immunologischer Vorgänge wurde von Billingham, Brent und Medawar (18) erkannt, die Theorien über nicht immunologische Vorgänge widerlegen konnten. Somit ist der Erfolg jeder homologen und heterologen Transplantation hämopoetischer Zellen an die Ausschaltung der immunkompetenten Zellen sowohl beim Spender als auch beim Empfänger gebunden.

Zur Unterdrückung der host-versus-graft-Reaktion bot sich zunächst eine Empfängervorbehandlung mit ionisierenden Strahlen an, da bereits Ende der 50er Jahre Untersuchungen von verschiedenen Autoren vorlagen, wonach eine Verlängerung der Toleranz gegenüber Knochenmarktransplantaten durch Erhöhung der R-Dosis erzielt werden konnte (Zusammenfassung vgl. van Bekkum (19)). Dies gelang sowohl im homologen, als auch im heterologen System. Zwar sind Zellen der myeloischen Reihe ebenso wie lymphatische Zellen extrem strahlensensibel. Eine längerdauernde Immunsuppression läßt sich aber nur mit sehr hohen Dosen ionisierender Strahlen erzielen, die das Leben der Tiere auf Grund von Komplikationen zunächst von seiten des Intestinaltraktes, später auch von seiten des Zentralnervensystems bedrohen (20).

Eine Verminderung der Strahlendosis ohne gleichzeitigen Verlust der Immunsuppression, um die unerwünschten Strahlensyndrome zu umgehen, ist somit von großer Bedeutung. Als Möglichkeit bietet sich die Kombination von Ganzkörperbestrahlung mit anderen immunsuppressiven Maßnahmen an. Der vorliegenden Arbeit liegt die Aufgabe zugrunde experimentell zu ermitteln, ob und in welchem Maß die Strahlendosis vermindert werden kann, wenn der Empfänger zusätzlich mit Antilymphozytenserum vorbehandelt wird. Als Ausdruck für die Stärke der in dieser Kombination erzielten Immunsuppression kann die Dauer des Chimärismus nach Transplantation von histoinkompatiblem homologem Knochenmark angesehen werden.

Der immunsuppressive Effekt von Antilymphozytenserum ist seit geraumer Zeit bereits bekannt. Seren dieser Art zur Unterdrückung der Immunantwort des Empfängers auf Spenderzellen wurden erstmals von Woodruff 1960 und Waksman 1961 hergestellt und stellten einen echten Fortschritt für die homologe und heterologe Organtransplantation dar (Zusammenfassung vgl. Brendel (21)).

Gegen Lymphozyten gerichtetes Serum wird durch Immunisieren von Kaninchen mit präpariertem lymphatischen Material gewonnen. Der immunsuppressive Effekt beruht auf den so erhaltenen Antikörpern, die sich nun, der Maus subkutan injiziert, gegen das lymphatische System der Maus wenden. Grundsätzlich eignet sich jedes Tier zur Immunisierung, jedoch ist die Antikörperbildung beim Kaninchen besonders stark. Eine direkte Messung des immunsuppressiven Effekts eines so gewonnenen Serums erlaubt zum einen der zytostatische Test in vitro, zum anderen die Verlängerung der Toleranz eines Tieres gegenüber H2-inkompatiblen Hauttransplantaten.

Die Empfängervorbehandlung mit Antilymphozytenserum bzw. seiner gereinigten Form, dem Antilymphozytenglobulin, hat bereits Eingang in die Klinik gefunden; sein Hauptanwendungsbereich ist die Konditionierung des Empfängers vor einer Organtransplantation (Übersicht vgl. Brendel (22)).

Eine kombinierte immunsuppressive Vorbehandlung des

Empfängers mit Antilymphozytenserum und Ganzkörperbestrahlung führten Bau und Thierfelder (23) im heterologen System durch. Dabei gelang es ihnen, einen Chimärismus trotz deutlicher Reduktion der Strahlendosis zu erzielen.

Material und Methoden

1. Tiere

Für alle Versuche wurden hochgradig ingezüchtete Mäuserestämme verwendet. Als Empfänger-tiere dienten 10 bis 15 Wochen alte hybride Mäuse (C57BL6-CBA-T6) F_1 , im folgenden als CBL/CBA-T6 bezeichnet, aus den Jackson-Laboratorien, Bar Harbour, Maine/USA. Knochenmarkspender waren Tiere des Stammes Balb c, bezogen von Bomholtgaard, Ry/Dänemark.

Die Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein Durchschnittsgewicht zwischen 25 und 30g. Jeweils 6 Tiere wurden in einem Käfig vom Typ Makrolon III gehalten, sie erhielten Sniff Mäusefutter (Altromin).

Ca. 10 bis 15 Wochen alte Kaninchen wurden zur Immunisierung und Gewinnung von Antilymphozytenserum verwendet. Die Kaninchen wurden von einem örtlichen Händler bezogen.

2. Herstellung eines heterologen Antilymphozytenserums

Für alle Versuche wurde ein Kaninchen-anti-Maus-Thymozytenserum verwendet. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der von Gray (24) angegebenen Methode insofern, als für die Immunisierung der Kaninchen nicht mehr Lymphknotenzellen verwendet wurden, sondern präparierte Thymuszellen. Die Möglichkeit, durch ein

derartiges Serum zu einer - gemessen an der Verminderung der Zahl kleiner Lymphozyten sowohl peripher als auch zentral in thymusabhängigem Gewebe - stärkeren Immunsuppression zu gelangen, konnte Turk (25) zeigen. Da die Verwandtschaft beider Seren hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber kleinen Lymphozyten sehr groß ist, sei weiterhin der Begriff Antilymphozytenserum (ALS) verwendet.

Für die Herstellung eines heterologen ALS wurden 12 bis 15 Wochen alten Kaninchen je 100×10^6 CBL Mäusethymuszellen injiziert. Die Erstimmunisierung sowie die Boostungen am 21., 22. und 23. Tag erfolgten durch intravenöse Injektionen der Zellsuspension. Am 28. Tag wurden jedem Tier ca. 100 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen, am 32. Tag wurden die Kaninchen entblutet. Durch Zentrifugieren bei 4000 U/min wurden Serum und zelluläre Bestandteile voneinander getrennt. Zur Sterilisierung wurde den Seren Natriummerthiolat in einer Verdünnung von 1:10.000 (1 Tropfen auf 5 ml Serum) zugegeben. Die Seren wurden bei -20°C gelagert. Jeweils 8 Kaninchen wurden für einen Pool immunisiert.

Toxizitätsprobe

4 ca. 6 Wochen alte CBL Mäuse erhielten an 4 aufeinanderfolgenden Tagen 0,25 ml einer kleinen gepoolten Menge der einzelnen Seren intraperitoneal injiziert. Starb eines der Tiere, so erfolgte eine erneute Toxizitätsprobe mit den einzelnen Seren. Waren die toxischen Seren er-

mittelt, so konnten die übrigen Seren gepoolt werden.

Kontrolle der Stärke der Immunsuppression

10 bis 12 Wochen alte CBL-Mäuse erhielten an 8 aufeinanderfolgenden Tagen je 0,25 ml Serum intraperitoneal.

Am 9. Tag erfolgte eine Transplantation von CBA-Haut auf die vorbehandelten Tiere. Kontrollen des Transplantats wurden am 16., 18., 21. Tag und weiter in Abständen von jeweils 2 bis 3 Tagen nach Transplantation vorgenommen. Hatten mindestens 50% der Tiere das Transplantat am 16. Tag noch nicht abgestoßen, so war das verwendete Serum als immunsuppressiv wirksam anzusehen. Bei den verwendeten Seren zeigten noch ca. 50% der Tiere eine Toleranz gegenüber Hauttransplantaten bis zum 18. Tag.

3. Herstellung eines heterologen Antithetaserums

Die Herstellung des Serums erfolgte nach Rodt, Thierfelder und Eulitz (26). Die Hirne von 12 CBA-Mäusen wurden blutfrei präpariert, mit NaCl abgespült und mit der doppelten Menge isotonischer Kochsalzlösung zu einer homogenen Suspension gepottert. Für die Erstimmunisierung erhielten 8 Kaninchen 0,75 ml der erhaltenen Suspension zusammen mit derselben Menge an Freudschem Adjuvans an drei Stellen subkutan injiziert. Boosterungen erfolgten am 14., 15., 16. und 23. Tag intravenös. Am 28. Tag wurden ca. 100 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen, am 31. Tag wurden die Tiere entblutet. Nach dem Abseren durch

Zentrifugieren bei 4000 U/min erfolgte Konservierung mit Na-Merthiolat und Lagerung der Seren bei -20°C .

Zur Eliminierung kreuzreagierender Antikörper wurden die Seren mit NMRI-Leber- und Balbplasmozytomzellen absorbiert. .

Präparation von Leber- und Plasmozytomzellen

Die Leber wurde mit 9 Volumina isotonischer Kochsalzlösung zu einer homogenen Suspension gepottert, 15 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zentrifugat erneut in Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zentrifugiert. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren klar erschien. Plasmozytomzellen wurden in derselben Weise von Balb MOPC 21 a Plasmozytom präpariert.

Absorption

Die präparierten Leber- und Plasmozytomzellen wurden jeweils mit Serum in einem Gewichtsverhältnis von 1:2 vermengt und zunächst 30 Minuten bei Zimmertemperatur, dann bei 4°C inkubiert. Die Absorption wurde erst zweimal mit Leber- und dann anschließend einmal mit Plasmozytomzellen durchgeführt. Im Anschluß an die letzte Zentrifugierung wurde das Serum durch Ultrazentrifugation (Beckmann¹², Rotor T 50, 40.000 RPM) gereinigt und steril filtriert (Milliporen 0,22).

Die IgG-Fraktion des Serums konnte durch Ammoniumsulfat-

präzipitation und anschließender DEAE-Zellulose-Austauschchromatographie isoliert werden.

Cytotoxischer Effekt

Der cytotoxische Effekt des Antithetaserums, insbesondere seine Spezifität, kann in der Komplementbindungsreaktion nachgewiesen werden. Dabei wird die Wirksamkeit des Serums einmal gegen Thymozyten zum anderen gegen Zellen des Knochenmarks getestet.

Bei den verwendeten Seren konnte in den zytotoxischen Testen eine hohe Spezifität gegenüber Thymuszellen und eine geringe Toxizität gegenüber Knochenmarkzellen festgestellt werden. Dies konnte in der KBR bestätigt werden: Thymus zwischen 1:64 und 1:256, Knochenmark zwischen 1:2 und 1:8.

4. Bestrahlung

Jeweils 18 Tiere konnten in einer kreisrunden Trommel ganzkörperbestrahlt werden. Als Strahlenquelle diente ein ¹³⁷Caesium Gerät (Siemens, Typ Gammatron). Die Strahlendosis betrug 55 R/min, der Abstand der Strahlenquelle vom Präparat 57 cm.

Für die durchgeführten Versuche wurden die Tiere mit folgenden Gesamtdosen ganzkörperbestrahlt:

Versuchsreihe I: 900 R (Bestrahlungsdauer: 16 min 21 sec)

Versuchsreihe II: 800 R (Bestrahlungsdauer: 14 min 32 sec)

Versuchsreihe III: 700 R (Bestrahlungsdauer: 12 min 43 sec)

Versuchsreihe IV: 600 R (Bestrahlungsdauer: 10 min 54 sec)

Versuchsreihe V: 500 R (Bestrahlungsdauer: 9 min 05 sec)

5. Knochenmarktransplantation

Mäuse des Stammes Balb wurden durch Äther getötet. Zur Gewinnung des Knochenmarkes wurden den vier Beinen der Tiere zunächst Femur und Tibia entnommen. Nach Präparation der Knochen wurden die Epiphysen abgeschnitten und die Diaphysen mit einer sterilen Elektrolytlösung (L-15-Medium) aus einer Einmalspritze durchspült. Das Knochenmark konnte in einer sterilen Petrischale aufgefangen werden. Nach Zerkleinerung größerer Markbrocken wurde die Zellsuspension in einem eisgekühlten Meßbecher gesammelt. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl des erhaltenen Pools konnte die Suspension 10 Minuten bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert, der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zentrifugat in Antithetaserum inkubiert werden. Dabei wurde der gewonnenen Zellmenge zunächst Antithetaserum zugesetzt und dann die Zellsuspension mit L-15-Medium so stark verdünnt, daß in 1 ml Gesamtflüssigkeit 500 Millionen Zellen enthalten waren. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über 30 Minuten. Anschließend mußte die Zahl der lebenden Zellen mit Hilfe von Trypanblaufärbung bestimmt werden, um den zytotoxischen Effekt des Antithetaserums bei der Transplantation ausgleichen zu können. Die Zellsuspension wurde dann mit L-15 so stark verdünnt, daß sich in 3 ml 500 Millionen lebende Zellen befanden. Für die Transplanta-

tion erhielt jedes der Tiere 0,3 ml der Zellsuspension entsprechend einer Zellzahl von 50 Millionen. Dabei wurden die Zellen langsam in die Schwanzvenen der Mäuse injiziert.

Bei der Präparation und der anschließenden Transplantation der Spenderzellen galt es zwei Punkte genau zu beachten:

1. Zur Verhinderung einer möglichen späteren Sepsis mußte sowohl bei der Präparation der Zellen als auch bei der Transplantation streng aseptisch vorgegangen werden. Dies war schon im Hinblick auf die vorausgegangene immunsuppressive Behandlung der Empfängertiere von großer Bedeutung. Eine Anzahl von Vorversuchen scheiterte an der Nichtbeachtung dieses Punktes.
2. Die Injektion der Spenderzellen mußte langsam erfolgen, um zu vermeiden, daß die Zellen agglutinierten. Nur so war eine mögliche Embolie zu verhindern.

Durch die Beachtung dieser beiden Punkte konnte die Mortalität gegenüber Vorversuchen deutlich vermindert werden. Auf diese Weise wurden genügend Tiere erhalten, die auch weit nach dem 100. Tag noch auf ihren chimäristischen Zustand untersucht werden konnten.

6. Beobachtung der Tiere nach Transplantation

Alle Versuchstiere wurden wöchentlich einmal gewogen, um eine eventuell auftretende chronische graft-versus-host-Reaktion zu erkennen. Gleichzeitig wurde auch nach

anderen Symptomen dieser durch die Spenderzellen bedingten Erkrankung der Tiere gesucht, so z.B. Veränderungen des Haarkleides oder Auftreten von Diarrhöen. Registriert wurden auch in diesem Zusammenhang Anzahl und Zeitpunkt von Todesfällen. Die früher übliche Infektionsprophylaxe durch Streptomycinbeimengung zum Trinkwasser wurde bei den beschriebenen Versuchen nicht mehr durchgeführt.

7. Nachweis von Chimären

Der Nachweis von Spenderzellen im Empfängerorganismus wurde nach der von Ford (13) beschriebenen Methode zytologisch an Hand von Chromosomenpräparaten durchgeführt.

Herstellung von Chromosomenpräparaten

3 Stunden vor der Präparation der Knochenmarkzellen wurde den Tieren 0,12 mg Colcemid in 0,3 ml isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt. Die Zellen des Knochenmarks wurden wie oben beschrieben gewonnen; allerdings wurden hierbei nur die hinteren Beine verwendet. Aus ökonomischen Gründen wurde anstelle des L-15-Mediums hier Hanks Elektrolytlösung zum Durchspülen der Diaphysen benutzt. Die erhaltenen Zellsuspension jedes einzelnen Tieres wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und zum Zentrifugat 10 ml hypotonischer Natriumcitratlösung (0,95%ig)

gegeben. Nachdem die Zellsuspension 20 Minuten bei 37°C inkubiert worden war, wurde sie erneut bei 800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zentrifugat mit Fixativ, bestehend aus einer Methanol-Eisessig-Mischung im Verhältnis 1:3, versetzt. Nach mehrfacher Wiederholung des Fixierungsvorgangs konnten die Zellen mit Hilfe einer Pasteur-Pipette auf eisgekühlte Objektträger gebracht werden. Anschließend wurden die Präparate mehrmals kurz durch die Flamme gezogen und nach Lufttrocknung beschriftet. Die Färbung erfolgte mit Giemsa-Lösung für die Mikroskopie.

Auswertung der Chromosomenpräparate

Colchizin verhindert die Aktion des Spindelapparates bei der Zellteilung. Zellen, die sich in Teilung befinden, bleiben auf der Stufe der Metaphase stehen. Besonders groß ist der Gewinn in rasch proliferierendem Gewebe, z.B. innerhalb des Knochenmarks. So eignet sich Colchizin hervorragend für die Präparation hämopoetischer Zellen.

Die Zellen der Metaphase sind für die mikroskopische Auswertung nach der oben beschriebenen Präparation insofern gut geeignet, als ihre Chromosomen nicht mehr verknäuelte und unübersichtlich im Zellinneren liegen, sondern getrennt voneinander und überschaubar angeordnet sind.

Durch den Aufprall der Zellen auf den Objektträger ver-

lieren die Chromosomen zwar ihre ursprüngliche biologische Ordnung, jedoch läßt sich ihre Vollständigkeit sehr leicht durch Auszählen bestimmen.

Nur Mitosen, die 40 Chromosomen besaßen und damit vollständig waren, wurden für die Auswertung verwendet.

Mit dem Mikroskop wurden die Mitosen bei 16-facher Vergrößerung (Okular 12,5 x) aufgesucht, dann bei 100-facher Vergrößerung in Ölimmersion auf ihre Zugehörigkeit zum Spender- oder Empfängertier hin untersucht.

Diese Untersuchung war einfach, da bei allen Versuchen empfängereigene Mitosen ein T6-Chromosom, meist in Form von drei Punkten sichtbar (Abb. 1), besaßen und daher mit Spendermitosen, die ein normales Chromosomenbild aufwiesen (Abb. 2), nicht verwechselt werden konnten.

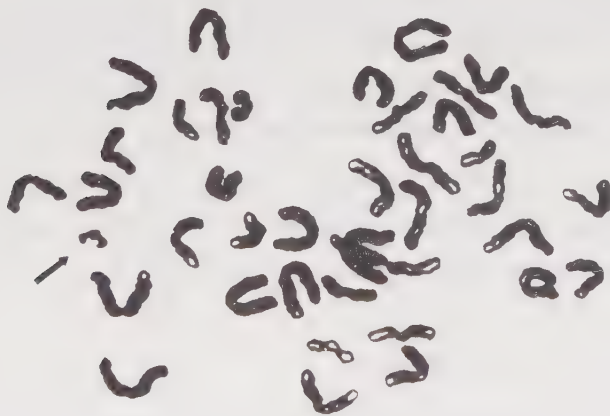


Abb. 1: Mitose einer empfängereigenen Zelle mit T6-Chromosom (Pfeil)

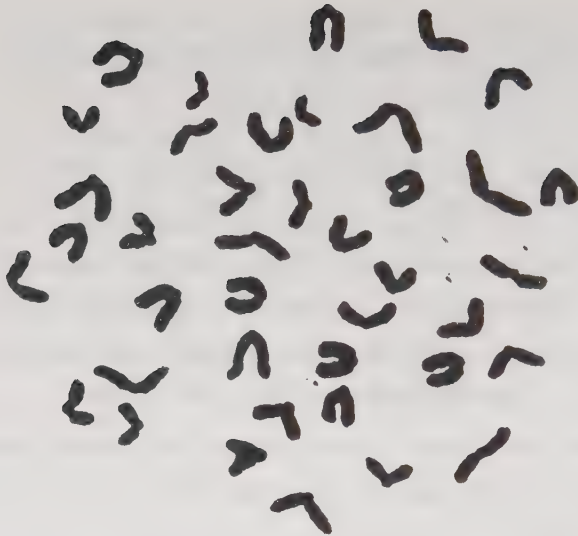


Abb. 2: Mitose einer Spenderzelle

Häufig zeigte sich das Bild eines Teilchimärismus.

Jedoch ist der Nachweis einiger empfangereigener Zellen bedeutungslos, da es sich hierbei um Stromazellen des Empfänger Knochenmarks oder andere mitpräparierte Bindegewebszellen des Empfängers handeln dürfte.

Für die Zuteilung zum Spender oder Empfänger wurden in der Regel 100 Mitosen, mindestens aber 50, ausgezählt, um die Fehlerquote möglichst klein zu halten.

8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test. Dabei wurde das chimäristische Verhalten ALS-vorbehandelter und bestrahlter Gruppen mit dem der nur bestrahlten Gruppe verglichen.

Darüber hinaus wurden die angewandten ALS-Konditionierungsschemata untereinander auf statistisch signifikante Unterschiedlichkeit hin untersucht. Schließlich wurden die Gruppen eines Versuches mit denen der anderen Versuche verglichen, um eine möglicherweise erzielte Immunsuppression durch ALS-Applikation bei reduzierter Strahlendosis statistisch abzusichern.

Die für die statistische Auswertung verwendeten Chimären hatten, von wenigen Ausnahmen abgesehen, einen Anteil von Spenderzellen zwischen 85 und 100%. 4 Tiere hatten einen Anteil an Spenderzellen zwischen 55 und 70%. Tiere, die einen Anteil von Spenderzellen von unter 50% hatten, wurden als nicht mehr chimäristisch angesehen und als Reversals eingestuft.

Die statistische Auswertung der Gewichtskurven erfolgte mit Hilfe des T-Testes.

Versuchsaufbau

Um den Chimärismus über einen langen Zeitverlauf beurteilen zu können, wurden die ersten drei Versuche mit einer verhältnismäßig hohen Zahl von Tieren angesetzt. Im einzelnen wurden für die durchgeführten Versuche folgende Größenordnungen verwendet:

Versuchsreihe I	74 Mäuse
Versuchsreihe II	66 Mäuse
Versuchsreihe III	66 Mäuse
Versuchsreihe IV	12 Mäuse
Versuchsreihe V	12 Mäuse

Alle Mäuse eines Versuches waren gleichaltrig. Je 6 Tiere wurden in einem Käfig untergebracht.

Die erste Gruppe der Tiere jedes Versuches blieb jeweils ALS-unbehandelt. Als immunsuppressive Vorbehandlung wurde lediglich eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt, die je nach Versuch 900 R, 800 R, 700 R, 600 R oder 500 R betrug. Die Knochenmarktransplantation erfolgte 24 Stunden nach der Bestrahlung.

Bei der zweiten Gruppe der Tiere bestand die immunsuppressive Vorbehandlung zunächst aus einer ALS-Applikation. Dabei erhielt jedes Tier an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 0,25 ml ALS subkutan injiziert. Nach einer Pause von drei Tagen wurden die Tiere am 7. Tag der Vorbehandlung zusammen mit den Tieren der ersten Gruppe ganzkörperbestrahlt. 24 Stunden später erfolgte die Trans-

plantation des Knochenmarks.

Bei der dritten Versuchsgruppe wurde die ALS-Substitution modifiziert. Rössler (27) gab für seine Versuche als ideales Konditionierungsschema zur Unterdrückung einer h.v.g. nach Transplantation homologer Zellen eine dreitägige ALS-Applikation an, wobei die Bestrahlung nach einer dreitägigen Pause und die Transplantation 24 Stunden nach der Bestrahlung erfolgte. Durch eine Modifizierung des ALS-Konditionierungsschemas in den beschriebenen Versuchen sollte die Richtigkeit dieser Aussage an Hand des Chimärismusanachweises im Knochenmark der Empfängertiere nachgeprüft werden.

Tabelle I dient der Orientierung über die durchgeführten Versuche, die immunsuppressive Vorbehandlung und die Zeitpunkte der Kontrolle des Chimärismus.

Versuch	Immunsuppressive ALS-Beh.	Behandlung R-Dosis	Auswertung Tage am
I	1)	- - -	900 R
	2)	3/6	900 R
	3)	3/3	900 R
	4)	6/3	900 R
II	1)	- - -	800 R
	2)	3/3	800 R
	3)	3/6	800 R
III	1)	- - -	700 R
	2)	3/3	700 R
	3)	6/3	700 R
IV	1)	- - -	600 R
	2)	3/3	600 R
V	1)	- - -	500 R
	2)	3/3	500 R

Tab. I: Orientierung über durchgeführte Versuche: immunsuppressive Vorbereitung, Höhe der Strahlendosis und Zeitpunkte der Kontrolle des Chimärismus. Alle Tiere erhielten 24 Stunden nach der Gantkörperbestrahlung 50×10^6 Balb-Knochenmarkzellen intravenös injiziert.

Erläuterung: 3/6 = 3 Tage ALS - 6 Tage Pause
 3/3 = 3 Tage ALS - 3 Tage Pause
 6/3 = 6 Tage ALS - 3 Tage Pause

Fragestellung

H2-inkompatible Knochenmarkspenderzellen werden vom Empfänger innerhalb weniger Tage abgestoßen. Maßgebend beteiligt sind daran die immunkompetenten Zellen des Empfängers, die den Antigencharakter der Spenderzellen vermutlich an der Struktur der Zellmembran erkennen und eine Immunantwort einleiten.

Eine der Transplantation vorausgehende Immunsuppression, die sich speziell gegen die immunkompetenten Zellen des Empfängers richtet, ermöglicht ein Angehen des Transplantats und damit einen Zellchimärismus.

Es war nun zu untersuchen, inwieweit Antilymphozytenserum als ein insbesondere gegen immunkompetente Zellen gerichtetes Agens die bisher übliche immunsuppressive Vorbehandlung mit ionisierenden Strahlen zu ersetzen vermag.

Zugleich konnte die immunsuppressive Wirkung des ALS im Konditionierungsschema 3/3 gegenüber anderen Behandlungsschemata getestet werden.

Die Suche nach einer g.v.h. ließ auf die Wirksamkeit des verwendeten Antithetaserums in dem System Balb-Knochenmarkzellen auf CBL/CBA-T6 Mäuse schließen.

Ergebnisse

1. Chimärismus

Versuchsreihe I

Eine immunsuppressive Vorbehandlung, die nur aus einer Ganzkörperbestrahlung von 900 R bestand, ergab für einen Teil der Tiere einen 100%igen Chimärismus über den 200. Tag hinaus. Ein Tier hatte bereits am 40. Tag die Spenderzellen abgestoßen, ab dem 100. Tag wurden entweder 100%ige Chimären oder Reversals gefunden, ein Teilchimärismus konnte nur bei einem Tier gefunden werden.

Mit ALS vorbehandelte und mit 900 R ganzkörperbestrahlte Tiere zeigten bis zum 250. Tag einen 100%igen Chimärismus, von dem nur ein Tier mit einem Teilchimärismus am 40. Tag eine Ausnahme macht.

Abbildung 3 zeigt den Chimärismus jedes ausgewerteten Tieres, angegeben in Prozenten zu bestimmten Zeitpunkten. Die dabei auffallende scheinbare Überlegenheit ALS-vorbehandelter Tiere konnte statistisch nicht belegt werden (vgl. Tab III).

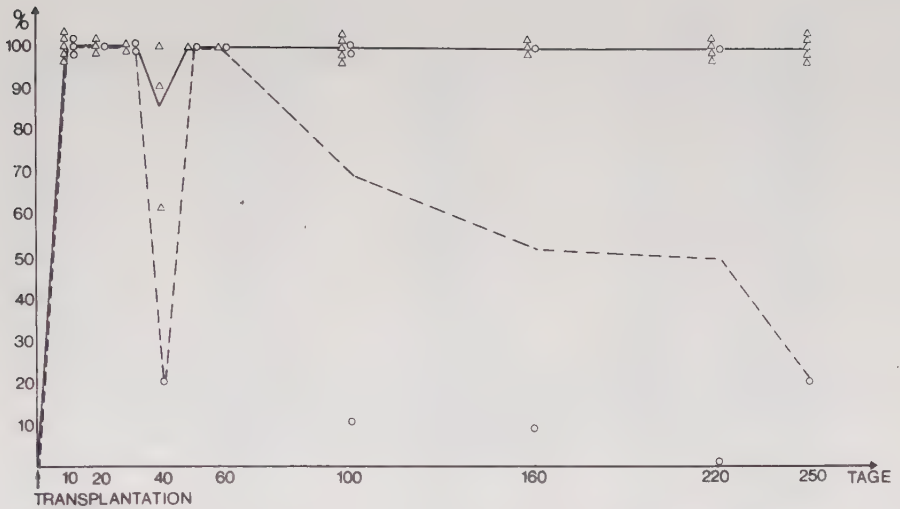


Abb. 3: Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung bei unterschiedlicher immunsuppressiver Vorbehandlung

—△— Vorbehandlung mit ALS und 900 R Bestrahlung
-○- Vorbehandlung mit 900 R Bestrahlung

Abbildung 4 läßt den Chimärismus unter Berücksichtigung der unterschiedlichen ALS-Applikationen abhängig vom Zeitpunkt der Auswertung erkennen. Im einzelnen wurden folgende Konditionierungsschemata verwendet:

- 1) 3 Tage ALS - 3 Tage Pause (3/3)
- 2) 6 Tage ALS - 3 Tage Pause (6/3)
- 3) 3 Tage ALS - 6 Tage Pause (3/6)

Dabei läßt sich grundsätzlich durch jedes der genannten Konditionierungsschemata ein 100%iger Chimärismus bis zum 250. Tag erzielen.

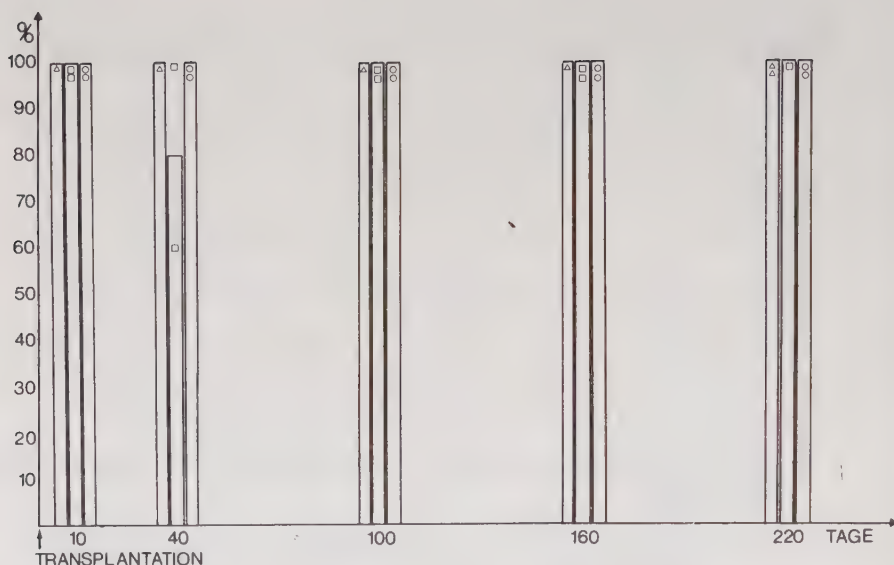


Abb. 4: Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung nach unterschiedlichen ALS-Konditionierungsschemata:

△ = 3 Tage ALS - 3 Tage Pause
 □ = 6 Tage ALS - 3 Tage Pause
 ○ = 3 Tage ALS - 6 Tage Pause

In Tabelle II ist das chimäristische Verhalten der in Versuch I ausgewerteten Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte wiedergegeben. Dabei wird deutlich, daß Tiere, die vor Transplantation zur Immunsuppression nur eine Ganzkörperbestrahlung von 900 R erhalten hatten, sich im ersten Zeitabschnitt zwischen 10. und 60. Tag überhaupt nicht und im zweiten Zeitabschnitt zwischen 100. und 250. Tag nur geringfügig und, wie aus Tabelle III zu ersehen ist, statistisch nicht signifikant unterscheiden.

Vorbehandlg.	10. bis 60. Tag			100. bis 250. Tag		
	Gesamt- zahl	Tiere mit Zahl	Chimär. %	Gesamt- zahl	Tiere mit Zahl	Chimär. %
900 R	9	8	90%	7	4	55%
3/6 ALS + 900 R	4	4	100%	6	5	80%
6/3 ALS + 900 R	5 ⁺	3	100%	4	4	100%
3/3 ALS + 900 R	5	5	100%	3	3	100%

Tab. II: Anzahl der Chimären sowie deren prozentualer Anteil an der Gesamtzahl ausgewerteter Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte, aufgeschlüsselt nach der unterschiedlichen immunsuppressiven Vorbehandlung.

⁺ ein Tier mit einem Anteil an Spenderzellen von 58%

Tabelle III zeigt, daß sich Tiere mit einer immunsuppressiven Vorbehandlung durch ALS und Ganzkörperbestrahlung in ihrem chimäristischen Verhalten nicht signifikant von Tieren unterscheiden, die nur mit 900 R ganzkörperbestrahlt wurden.

Vorbehandlg.	Ganzkörperbestrahlung 900 R		
	10. bis 60.	100. bis 250.	10. bis 250. Tag
3/6 ALS + 900 R	n. s.	n. s.	n. s.
6/3 ALS + 900 R	n. s.	n. s.	n. s.
3/3 ALS + 900 R	n. s.	n. s.	n. s.

Tab. III: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes, wobei die ALS-vorbehandelten Gruppen in ihrem chimäristischen Verhalten mit der ALS-unbehandelten Gruppe innerhalb verschiedener Zeitabschnitte verglichen wurden.

n. s. = statistisch nicht signifikant unterschieden

Somit bringt ALS in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung von 900 R denselben immunsuppressiven Effekt wie eine aus 900 R bestehende Ganzkörperbestrahlung allein. In jedem Fall ist ein langdauernder Chimärismus über den 200. Tag hinaus zu erwarten.

Versuchsreihe II

Werden Mäuse mit einer Strahlendosis von 800 R zur Immunsuppression 24 Stunden vor der Transplantation der Knochenmarkspenderzellen bestrahlt, so zeigt sich im Verlauf des Chimärismus kein einheitliches Bild. Offensichtlich stellt eine Strahlendosis von 800 R eine Grenzdosis dar, die je nach der individuellen Konstitution der Tiere noch oder nicht mehr zu einer Immunsuppression führt, die den hämopoetischen Spenderzellen zumindest ein Anwachsen ermöglicht. So findet man neben Chimären bis zum 150. Tag auch Tiere, die schon am 30. oder 40. Tag das Spenderknochenmark abgestoßen und durch eine eigene Proliferation ersetzt haben.

Bei Tieren, die mit ALS und einer Ganzkörperbestrahlung von 800 R immunsuppressiv vorbehandelt wurden, ist, wie Abbildung 5 zeigt, der Kurvenverlauf ähnlich. So zeigt sich auch im statistischen Vergleich beider Kurven kein signifikanter Unterschied (vgl. Tab VI). Somit wird deutlich, daß bei einer Ganzkörperbestrahlung von 800 R durch eine zusätzliche ALS-Behandlung hinsichtlich des chimäristischen Verhaltens keine Verbesserung erzielt werden

kann.

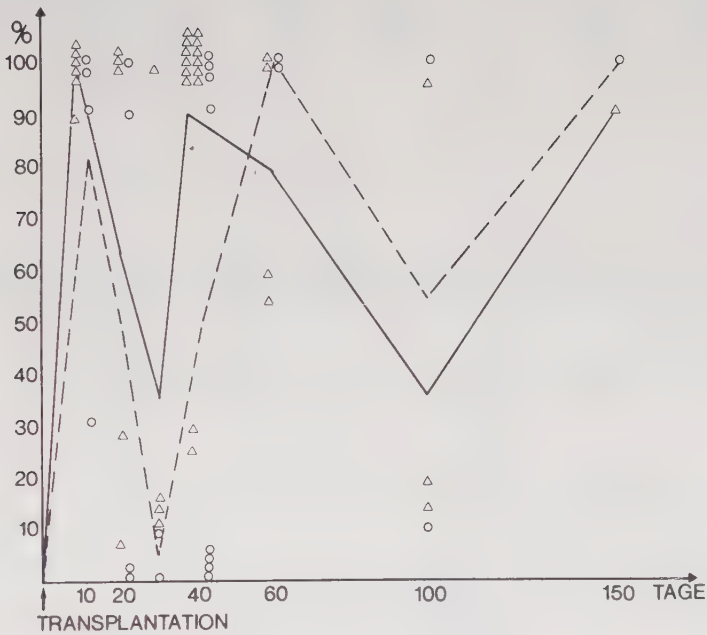


Abb. 5: Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung bei unterschiedlicher immunsuppressiver Vorbehandlung

—△— Vorbehandlung mit ALS und 800 R
 -○- Vorbehandlung mit 800 R

In Tabelle IV wurde das chimäristische Verhalten der ausgewerteten Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte untersucht, zugleich wurden die unterschiedlichen immunsuppressiven Behandlungsschemata dabei berücksichtigt.

Vorbehandlg.	10. - 30. Tag			40. - 60. Tag			100. - 150. Tag		
	Ges.- zahl	Tiere m. Zahl	Chim. %	Ges.- zahl	Tiere m. Zahl	Chim. %	Ges.- zahl	Tiere m. Zahl	Chi %
800 R	10	5	50%	10	6	60%	3	1	30
3/6 ALS + 800 R	6	3	50%	8	7 ⁽⁺	90%	1	0	0
3/3 ALS + 800 R	10	7	70%	10	9 ⁽⁺⁺	90%	3	2	75

Tab IV: Anzahl der Chimären sowie deren prozentualer Anteil an der Gesamtzahl ausgewerteter Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte, aufgeschlüsselt nach der unterschiedlichen immunsuppressiven Vorbehandlung

(+ ein Tier mit einem Anteil an Spenderzellen von 54%

(++ ein Tier mit einem Anteil an Spenderzellen von 58%

Auch nach Aufschlüsselung des chimäristischen Verhaltens nach der unterschiedlichen immunsuppressiven Vorbehandlung läßt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, auch innerhalb bestimmter Zeitabschnitte, nicht feststellen.

Im Vergleich des chimäristischen Verhaltens der einzelnen mit ALS vorbehandelten Gruppen erscheint das Konditionierungsschema 3/3 geringfügig besser (Abb. 6), jedoch konnte dies statistisch nicht bestätigt werden (Tab. V).

Vorbehandlg.	3/6 ALS + 800 R Ganzkörperbestrahlung			
	10. bis 30.	40. bis 60.	10. bis 60.	10. bis 150. Tag
3/3 ALS + 800 R	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Tab V: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes, wobei die ALS-vorbehandelten Tiere in ihrem chimäristischen Verhalten miteinander innerhalb verschiedener Zeitabschnitte verglichen wurden.

n. s. = statistisch nicht signifikant unterschieden

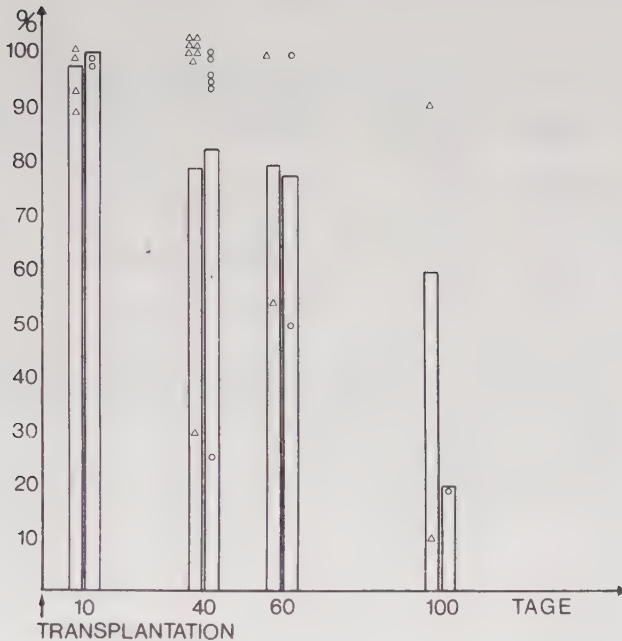


Abb. 6: Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung nach unterschiedlichen ALS-Konditionierungsschemata:

○ = 3 Tage ALS - 6 Tage Pause

△ = 3 Tage ALS - 3 Tage Pause

In Tabelle VI sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung wiedergegeben. Dabei wurde das chimäristische Verhalten der mit ALS vorbehandelten Gruppen und der nur mit 800 R bestrahlten Gruppe, einmal innerhalb bestimmter Zeitabschnitte und zum anderen über den gesamten Zeitraum der Versuchsdauer, auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. In keinem Fall konnte der Nachweis erbracht werden, daß durch eine ALS-Vorbehandlung - gemessen am chimäristischen Verhalten der ausgewerteten Mäuse - eine Verbesserung der Immunsuppression gegenüber der ALS-unbehandelten Gruppe erzielbar ist.

Vorbehdlg.	Ganzkörperbestrahlung mit 800 R				
	10.-30.	40.-60.	100.-150.	10.-60.	10.-150. Tag
3/3 ALS + 800 R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
3/6 ALS + 800 R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ALS + (o 800 R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. VI: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes, wobei die ALS-vorbehandelten Gruppen in ihrem chimäristischen Verhalten mit der ALS-unbehandelten Gruppe innerhalb verschiedener Zeitabschnitte verglichen wurden.

(o Zusammenfassung der beiden vorgenannten Gruppen
n.s. = statistisch nicht signifikant unterschieden

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß weder die Ergebnisse des Versuches I noch die von Versuch II die Vermutung unterstützen konnten, daß ALS als immunsuppressives Agens einen Teil der Strahlendosis zu ersetzen vermag. In beiden Versuchen ließen sich mit und auch ohne ALS über Monate dauernde Chimären erzeugen.

Mit Versuch III konnte dies aber eindeutig nachgewiesen werden. Die Höhe der Bestrahlungsdosis betrug dabei 700 R, ALS wurde nach den Mustern 3/3 und 6/3 appliziert.

Versuchsreihe III

Mit 700 R vorbestrahlte Mäuse zeigten bereits zum Zeitpunkt der ersten Auswertung keinen nennenswerten Chimärismus. Die Abstoßung des Spenderknochenmarks hatte

schon in den ersten Tagen stattgefunden, das empfänger-eigene hämopoetische System hatte sich innerhalb kurzer Zeit wieder erholt und die Proliferationszentren neu besiedelt. Demgemäß konnten Spenderzellen zu keinem Zeitpunkt in größerem Ausmaß gefunden werden. Eine Ausnahme stellte ein Tier dar, das am 80. Tag noch einen Chimärismus von 90% aufwies. Dabei handelte es sich zweifellos um ein Zufallsergebnis.

Wurden Tiere mit ALS vorbehandelt, wobei der Applikation grundsätzlich eine dreitägige Pause bis zur Bestrahlung folgte, so konnte ein Chimärismus noch bis zum 80. Tag nachgewiesen werden, dann jedoch nahm die Zahl der Chimären deutlich ab; am 180. Tag konnten im Knochenmark der ausgewerteten Tiere keine Spenderzellen mehr gefunden werden.

Abbildung 7 zeigt deutlich, daß eine der Bestrahlung vorausgehende ALS-Behandlung nicht nur zum Angehen des Transplantats führt, sondern auch einen lang anhaltenden Chimärismus nach sich zieht. Diese Überlegenheit der ALS-vorbehandelten Gruppen konnte statistisch belegt werden (vgl. Tab VII).

Vorbehandlg.	Ganzkörperbestrahlung mit 700 R		
	10. bis 40.	10. bis 100.	10. bis 180. Tag
3/3 ALS + 700 R	< 0,01	< 0,01	< 0,05
6/3 ALS + 700 R	< 0,05	< 0,05	< 0,05

Tab. VII: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes, wobei die ALS-vorbehandelten Gruppen in ihrem chimäristischen Verhalten mit der ALS-unbehandelten Gruppe innerhalb verschiedener Zeitabschnitte verglichen wurde. Die statistische Signifikanz wurde mit den Zahlen der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

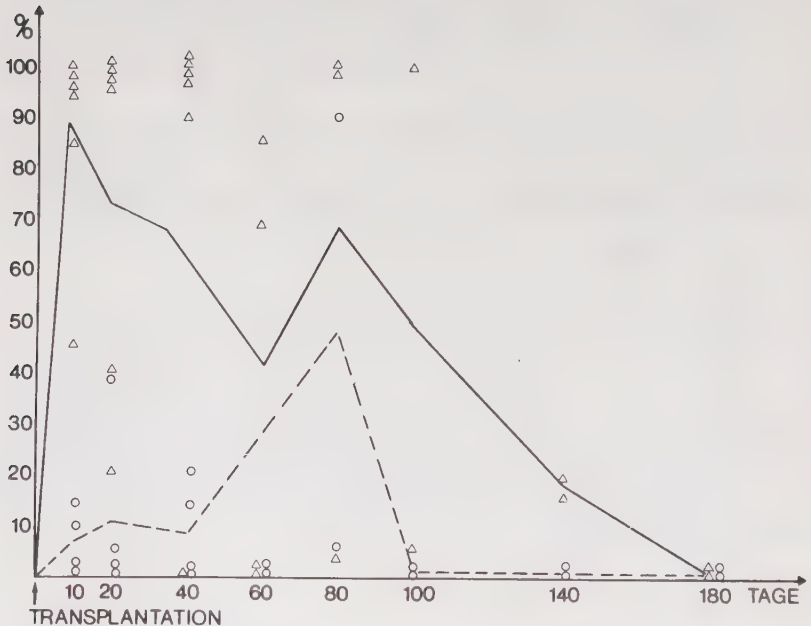


Abb. 7: Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung bei unterschiedlicher immunsuppressiver Vorbehandlung

—△— Vorbehandlung mit ALS und 700 R
 --○-- Vorbehandlung mit 700 R

Der Kurvenverlauf in Abbildung 7 macht den Wert einer immunsuppressiven Kombinationsvorbereitung der Empfängertiere deutlich.

Abbildung 8 zeigt wiederum den Chimärismus der Tiere unter Berücksichtigung der verwendeten ALS-Konditionierungsschemata. Dabei ist kein unterschiedliches Verhalten des Chimärismus festzustellen (vgl. a. Tab. IX).

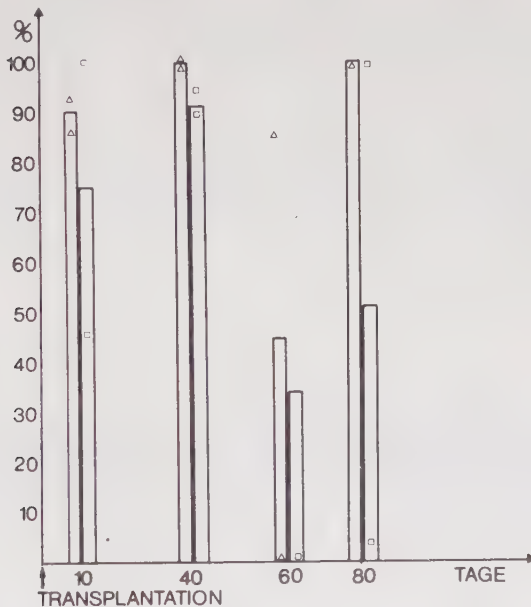


Abb. 8: Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung nach unterschiedlichen ALS-Konditionierungsschemata:

△ = 3 Tage ALS - 3 Tage Pause
□ = 6 Tage ALS - 3 Tage Pause

Wie bei den vorangehenden Versuchen wurde auch für diesen Versuch das chimäristische Verhalten nach bestimmten

Zeitabschnitten in einer Tabelle wiedergegeben (Tab. VIII). Auch den Werten dieser Tabelle läßt sich die günstige Wirkung des ALS auf das Angehen und Persistieren eines Knochenmarktransplantats entnehmen. Dabei wird zugleich erkennbar, daß Tiere, die nach einem Applikationsschema nach dem Muster 3/3 vorbehandelt waren, Tieren, die über 6 Tage mit ALS behandelt worden waren, geringfügig überlegen waren; jedoch wird dies in der statistischen Auswertung nicht deutlich (vgl. Tab. IX).

Vorbehandlg.	10. - 40. Tag			60. - 100. Tag			140. - 180. Tag		
	Ges.- zahl	Tiere m. Zahl	Chim. %	Ges.- zahl	Tiere m. Zahl	Chim. %	Ges.- zahl	Tiere m. Zahl	Chim.
700 R	12	0	0%	6	1	15%	4	0	0
3/3 ALS + 700 R	12	10	85%	3	2	75%			
6/3 ALS + 700 R	6	4	67%	6	3 ⁽⁺⁾	50%	4	0	0

Tab. VIII: Anzahl der Chimären sowie deren prozentualer Anteil an der Gesamtzahl ausgewerteter Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte, aufgeschlüsselt nach der unterschiedlichen immunsuppressiven Vorbehandlung.

(+ ein Tier mit einem Anteil an Spenderzellen von 68%

Tabelle VIII zeigt somit ebenfalls, daß ALS-vorbehandelte Tiere die Spenderzellen wesentlich länger tolerieren als Tiere, die nur mit 700 R vorbestrahlt wurden. Daneben läßt sich, ähnlich wie in Tabelle VII, eine leichte Überlegenheit der nach dem Muster 3/3 ALS-behandelten Tiere gegenüber Tieren erkennen, die ALS im Konditionierungsschema 6/3 erhielten.

Vorbehandlg.	3/3 ALS + 700 R Bestrahlung		
	10. bis 40.	60. bis 100.	10. bis 100. Tag
6/3 ALS + 700 R	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. IX: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes, wobei die ALS-vorbehandelten Gruppen in ihrem chimäristischen Verhalten miteinander innerhalb verschiedener Zeitabschnitte verglichen wurden.

n.s. = statistisch nicht signifikant unterschieden

Mit den Versuchen IV und V sollte geklärt werden, ob eine weitere Senkung der Strahlendosis noch ein Angehen oder Persistieren von Spenderknochenmark ermöglicht, wenn die Empfängertiere zusätzlich mit ALS nach dem Muster 3/3 immunsuppressiv vorbehandelt werden.

Versuchsreihe IV

Nach einer Ganzkörperbestrahlung von 600 R wurden die Spenderzellen innerhalb der ersten Tage nach der Transplantation vom Empfängertier abgestoßen. Die Regeneration des empfangereigenen Knochenmarks erfolgt rasch, so daß zum Zeitpunkt der ersten Auswertung nur noch empfangereigene Zellen im Knochenmark gefunden werden können.

Mit ALS nach dem Konditionierungsschema 3/3 vorbehandelte Tiere verzögerten die Abstoßung der Spenderzellen bis zum 40. Tag. So konnten bei der Auswertung am 10. Tag 100%ige Chimären gefunden werden, am 20. Tag war nur noch eines der beiden ausgewerteten Tiere voll

chimäristisch, das andere wies nur noch einen Teilchimärismus auf. Am 40. Tag bestand das gesamte Knochenmark der ausgewerteten Tiere wieder aus empfangereigenen Zellen; bei einem Tier konnte ein geringer Restchimärismus gefunden werden.

Die chimäristischen Verhältnisse der einzelnen zu bestimmten Zeitpunkten ausgewerteten Tiere sind in Abbildung 9A dargestellt.

Versuchsreihe V

Mit 500 R bestrahlte Mäuse ermöglichen dem Transplantat nicht, in den Proliferationszentren des Empfängers anzugehen; ein Chimärismus ließ sich nicht erzeugen.

Auch eine Vorbehandlung der Empfänger mit ALS führt weder zu einem Angehen des Transplantats noch zur Erzeugung eines kurzzeitigen Chimärismus.

Eine immunsuppressive Vorbehandlung der Empfänger mit ALS und einer Ganzkörperbestrahlung von 500 R war somit ebenso unwirksam wie eine Vorbestrahlung der Tiere mit 500 R allein.

Abbildung 9B zeigt deutlich die ungenügende immunsuppressive Vorbereitung der Empfänger in dieser Versuchsreihe.

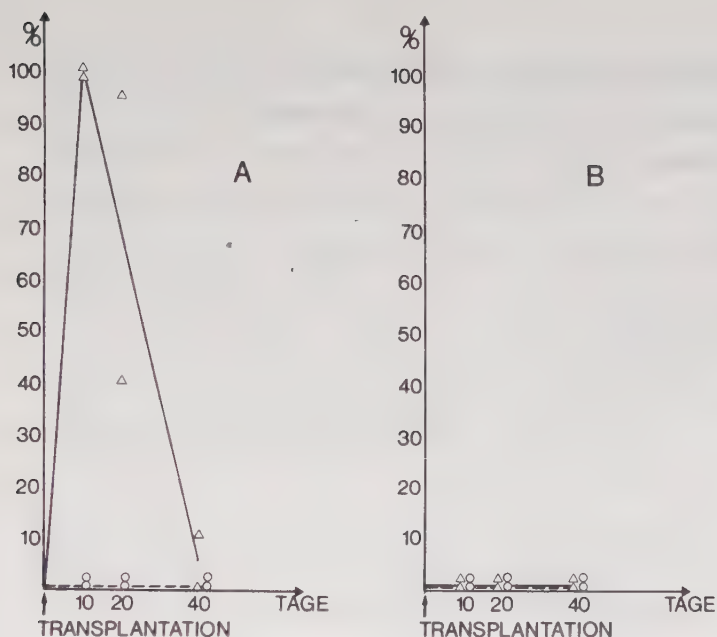


Abb. 9: A) Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung nach unterschiedlicher immunsuppressiver Vorbehandlung

—△— Vorbehandlung mit ALS und 600 R
 --○-- Vorbehandlung mit 600 R

B) Chimärismus in % in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Auswertung nach unterschiedlicher immunsuppressiver Vorbehandlung

—△— Vorbehandlung mit ALS und 500 R
 --○-- Vorbehandlung mit 500 R

2. Zustand der Tiere nach Transplantation

Vor den deletären Folgen einer Ganzkörperbestrahlung mit Dosen über 600 R konnten Mäuse durch Transplantation homologer oder auch heterologer hämopoetischer Zellen, gewonnen aus der Milz oder dem Knochenmark des Spendertieres, gerettet werden. Doch im Gegensatz zu Transplanta-

tionen im isologen System konnten Tiere, die homolog transplantiert worden waren, nur wenige Wochen länger am Leben erhalten werden, da das Leben der Tiere nach einer Knochenmarktransplantation von anderen Komplikationen bedroht war. So können durch die Transplantation H2-inkompatibler Zellen u.a. folgende Reaktionen ausgelöst werden:

- a) Die Empfängertiere stoßen das transplantierte Gewebe ab und ersetzen es durch eigene hämopoetische Zellen.
- b) Mit dem Transplantat übertragene immunkompetente Zellen des Spenders richten sich gegen den Empfänger und verursachen in der sog. graft-versus-host-Reaktion ein Krankheitsbild, das auch als *secondary disease* bezeichnet wird.

Bei allen Versuchen bestand grundsätzlich die Gefahr der Entwicklung einer g.v.h., da histoinkompatibles Knochenmark übertragen wurde.

Um von einer erfolgreichen Knochenmarktransplantation sprechen zu können, erscheint es wichtig, neben dem Nachweis des Chimärismus auch zeigen zu können, daß histoinkompatibles Knochenmark übertragen werden kann, ohne mit der Gefahr einer graft-versus-host-Reaktion rechnen zu müssen, wenn die Spenderzellen vor der Transplantation in einem Antithetaserum inkubiert wurden und dadurch frei von immunkompetenten Zellen des Spenders waren.

Zeichen einer akut oder auch chronisch verlaufenden g.v.h. sind neben Hautveränderungen, z.B. makroskopisch sichtbaren Läsionen und Depigmentierungen des Haarkleides der Mäuse, und Diarrhöen vor allem der deutliche Gewichtsverlust und die Mortalität.

Gewichtskontrolle und Mortalität waren bei allen Versuchen die entscheidenden Punkte zur Beurteilung des Verlaufs nach Transplantation und deuteten auf eine mögliche secondary disease hin.

Gewichtsverlauf und Mortalität bei Versuchsreihe I
(900 R Bestrahlung, bzw. ALS und 900 R Bestrahlung)

In den ersten 10 Tagen nach der Transplantation verloren die Tiere deutlich an Gewicht, erholten sich jedoch rasch und erreichten ihren Ausgangswert gegen den 60. Tag. Von da an war eine stetige Gewichtszunahme zu verzeichnen.

Abbildung 10 zeigt den Gewichtsverlauf in der Versuchsreihe I, dargestellt an Hand der statistisch ermittelten Mittelwerte und deren Standardabweichungen davon zu bestimmten Zeitpunkten des Versuchs.

Statistische Beurteilung: Die Meßdaten sämtlicher Zeitabschnitte der beiden Gruppen wurden im T-Test miteinander verglichen. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt - abgesehen von einer einzigen Ausnahme - ein statistisch sig-

nifikanter Unterschied zwischen der nur bestrahlten und der mit 3/3 ALS vorbehandelten und bestrahlten Gruppe festgestellt werden. Am 10. Tag lag der Mittelwert der ALS-behandelten Gruppe über dem der nur bestrahlten Gruppe (statistische Signifikanz: 0,05).

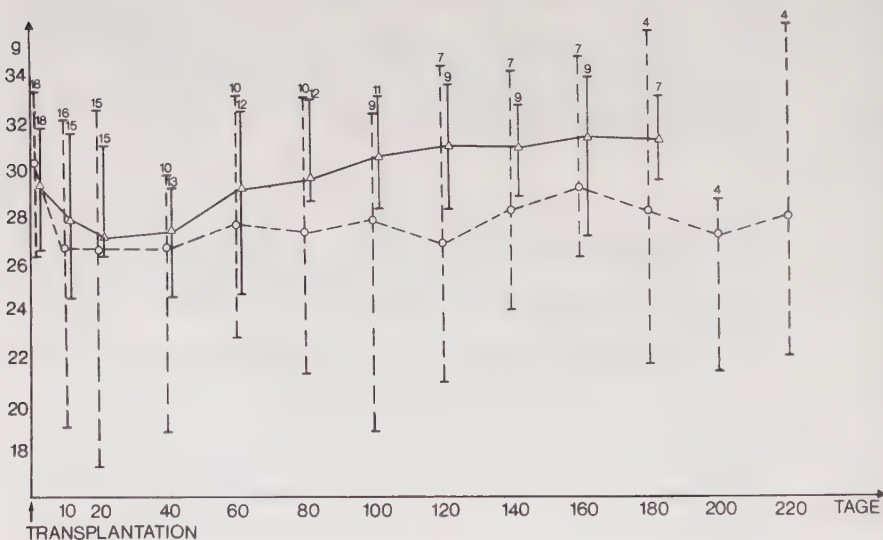


Abb. 10: Gewichtsverlauf innerhalb der Versuchsreihe I Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu bestimmten Zeitpunkten. Zusätzlich ist die Zahl der ausgewerteten Tiere zu jedem Zeitpunkt angegeben.

- △— Mittelwerte mit 3/3 ALS vorbehandelter und mit 900 R bestrahlter Tiere
- Mittelwerte nur mit 900 R bestrahlter Tiere

Einen Überblick über die Mortalität der Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte vermittelt Tabelle X.

	Transpl.-10.	10.-30.	30.-60.	60.-100.	nach 100. Tag
A	0	4 ⁽⁺⁾	0	1	2
B	0	1	0	2	0

Tab. X: Mortalität der Tiere nach der Transplantation innerhalb bestimmter Zeitabschnitte

A = nur bestrahlte Gruppe

B = mit ALS vorbehandelte und bestrahlte Gruppen

(+ alle Tiere stammten aus einem Käfig, so daß eine Infektion als Ursache wahrscheinlich ist.

Sowohl der unauffällige Gewichtsverlauf als auch die geringe Mortalität der Tiere nach der Transplantation lassen die Entwicklung einer g.v.h. unwahrscheinlich erscheinen.

Gewichtsverlauf und Mortalität bei Versuchsreihe II
(800 R Bestrahlung, bzw. ALS und 800 R Bestrahlung)

Innerhalb der ersten 10 Tage nach der Transplantation fällt ein starker Gewichtsverlust, insbesondere bei der nur bestrahlten Gruppe der Versuchsreihe, auf. Bis zum 60. Tag erreichte ein Großteil der Tiere wieder sein ursprüngliches Gewicht, lediglich Tiere aus der 3/6 ALS-vorbehandelten Gruppe verloren weiter an Gewicht. Die anderen Gruppen zeigten dagegen eine Gewichtszunahme oder behielten ihr wiedergewonnenes Ausgangsgewicht bei.

Die Gewichtsveränderungen der einzelnen Gruppen sind,

wiederum mit Hilfe der statistisch ermittelten Mittelwerte und deren Standardabweichungen zu bestimmten Zeitpunkten, in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

Statistische Beurteilung: Der deutliche Gewichtsverlust der nur bestrahlten Tiere am 10. Tag nach der Transplantation gegenüber dem der anderen Gruppen konnte mit Hilfe des T-Testes nur im Vergleich mit der mit 3/6 ALS-vorbehandelten und bestrahlten Gruppe statistisch belegt werden (statistische Signifikanz: 0,05). Zu sämtlichen anderen Zeitpunkten konnte keine signifikante Unterschiedlichkeit der gewonnenen Meßdaten der einzelnen Gruppen ermittelt werden.

Einen Überblick über die Mortalität der Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte vermittelt Tabelle XI.

	Transpl.-10.	10.-30.	30.-60.	60.-100.	nach 100. Tag
A	0	0	0	1	0
B	0	0	0	1	- -
C	0	1	0	0	0

Tab. XI: Mortalität der Tiere nach der Transplantation innerhalb bestimmter Zeitabschnitte.

A = nur bestrahlte Gruppe

B = 3/6 ALS-vorbehandelte und bestrahlte Gruppe

C = 3/3 ALS-vorbehandelte und bestrahlte Gruppe

Der Gewichtsverlauf und die Mortalität der nur bestrahlten Gruppe sowie der 3/3 ALS vorbehandelten und bestrahlten Gruppe schließen die Entwicklung einer g.v.h. aus.

Der Gewichtsverlauf der 3/6 ALS-vorbehandelten und bestrahlten Gruppe weist auf eine secondary disease bei zumindest einigen Tieren der Versuchsgruppe hin.

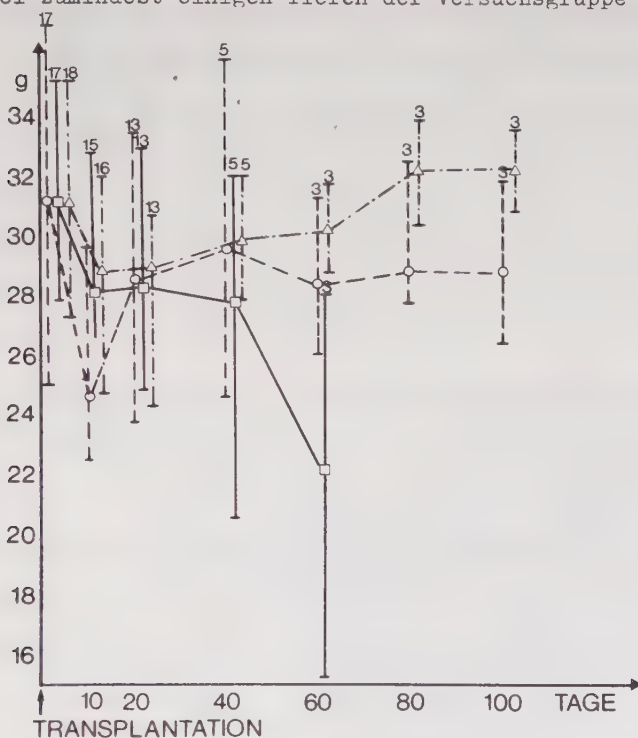


Abb. 11: Gewichtsverlauf innerhalb der Versuchsreihe II Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu bestimmten Zeitpunkten. Zusätzlich ist die Zahl der ausgewerteten Tiere zu jedem Zeitpunkt angegeben.

- Mittelwerte nur mit 800 R bestrahlter Tiere
- △— Mittelwerte mit 3/3 ALS vorbehandelter und mit 800 R bestrahlter Tiere
- Mittelwerte mit 3/6 ALS vorbehandelter und mit 800 R bestrahlter Tiere

Gewichtsverlauf und Mortalität bei Versuchsreihe III
(700 R Bestrahlung, bzw. ALS und 700 R Bestrahlung)

Nach der Transplantation der Spenderzellen war bei allen Gruppen ein deutlicher Gewichtsverlust bis zum 20. Tag hin zu verzeichnen. Besonders stark verloren wiederum Tiere, die nur vorbestrahlt waren, an Gewicht; sie erreichten auch erst am 80. Tag ihr Ausgangsgewicht wieder. Die Tiere aus den ALS-vorbehandelten Gruppen erholten sich schneller, sie konnten ihr Gewicht jenseits des 60. Tages sogar noch steigern.

Eine graphische Darstellung der Durchschnittsgewichte der einzelnen Gruppen zu bestimmten Zeitpunkten sowie ihrer Standardabweichungen zeigt Abbildung 12.

Statistische Beurteilung: Die gewonnenen Meßdaten der nur bestrahlten Gruppe unterscheiden sich von den Meßdaten ALS-vorbehandelter und bestrahlter Gruppen nicht signifikant. Dies gilt für jeden ausgewerteten Zeitpunkt. Jedoch besteht ein deutlicher Unterschied am 10. Tag zwischen den beiden ALS-vorbehandelten Gruppen (Signifikanz: 0,01), zu allen anderen Zeitpunkten konnte im T-Test keine Unterschiedlichkeit ermittelt werden.

Einen Überblick über die Mortalität der Tiere innerhalb bestimmter Zeitabschnitte vermittelt Tabelle XII.

Im Hinblick auf den Gewichtsverlauf und die Mortalität ist die Entwicklung einer g.v.h. unwahrscheinlich.

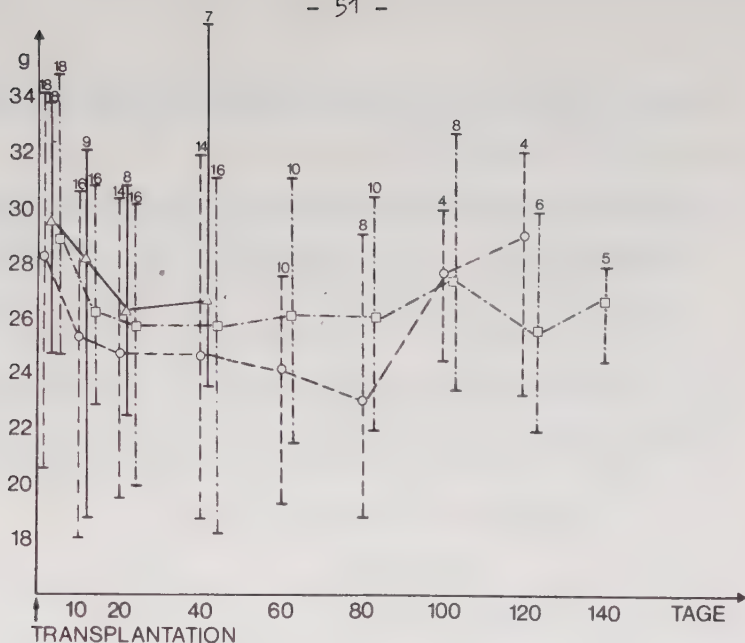


Abb. 12: Gewichtsverlauf innerhalb der Versuchsreihe III
Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen zu bestimmten Zeitpunkten. Zusätzlich ist die Zahl der ausgewerteten Tiere zu jedem Zeitpunkt angegeben.

- Mittelwerte nur mit 700 R bestrahlter Tiere
- Mittelwerte 6/3 ALS-vorbehandelter und mit 700 R bestrahlter Tiere
- △— Mittelwerte mit 3/3 ALS vorbehandelter und mit 700 R bestrahlter Tiere

	Transpl.-10.	10.-30.	30.-60.	60.-100.	nach 100. Tag
A	0	0	0	2	0
B	0	1	1	0	0
C	0	0	0	0	0

Tab. XII: Mortalität der Tiere nach der Transplantation innerhalb bestimmter Zeitabschnitte

- A = nur bestrahlt Gruppe
- B = 3/3 ALS vorbehandelte und bestrahlte Gruppe
- C = 6/3 ALS vorbehandelte und bestrahlte Gruppe

3. Zusammenfassung der gewonnenen Ergebnisse und statistische Beurteilung

Eine erfolgreiche Übertragung von H2-inkompatiblem Knochenmark hängt von einer ausreichenden immunsuppressiven Vorbereitung des Empfängers ab. Inwieweit die in dieser Arbeit angewendeten immunsuppressiven Maßnahmen ausreichend waren, um einen hohen Anteil an Chimären sowie einen langdauernden Chimärismus zu erzielen, zeigt Tabelle XIII, in der die Ergebnisse der Versuchsreihen I bis V zusammengefaßt dargestellt wurden.

Vorbedlfg.	Transpl.-20.	20.-40.	40.-100.	100.-180.	nach 180. Tag
ALS + 900 R	++++	++++	++++	++++	++++
900 R	++++	++++	+++-	++--	+---
ALS + 800 R	++++	+++-	+++-		
800 R	++--	++--	+++-		
ALS + 700 R	+++-	+++-	+++-	----	
700 R	----	----	----	----	
ALS + 600 R	+++-	----			
600 R	----	----			
ALS + 500 R	----	----			
500 R	----	----			

Tab. XII: Anteil der Chimären in % an der Gesamtzahl ausgewerteter Tiere bei den einzelnen Versuchsreihen innerhalb bestimmter Zeitabschnitte

++++	= 100%	der ausgewerteten Tiere waren Chimären
+++-	= 75%	der ausgewerteten Tiere waren Chimären
++--	= 50%	der ausgewerteten Tiere waren Chimären
+---	= 25%	der ausgewerteten Tiere waren Chimären
----	= 0%	der ausgewerteten Tiere waren Chimären

ALS vermag - das zeigt Tabelle XIII deutlich - innerhalb bestimmter Zeitabschnitte die Strahlendosis zu ersetzen.

In den Tabellen XIV und XV sind die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes wiedergegeben, wobei das chimäristische Verhalten der Tiere der Versuchsreihe III mit dem der Tiere der Versuchsreihen I und II verglichen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte einmal über einen kleineren Zeitraum, zum anderen über den gesamten Zeitraum der Versuche.

Vorbehdlg.	800 R		3/6 ALS+800 R		3/3 ALS+800 R		Tag
	10.-40.	10.-180.	10.-40.	10.-180.	10.-40.	10.-180.	
700 R	< 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,01	
3/3 ALS + 700 R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
6/3 ALS + 700 R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Tab. XIV: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes, wobei das chimäristische Verhalten der Tiere aus den Gruppen der Versuchsreihe III mit den Ergebnissen bei den Gruppen der Versuchsreihe II innerhalb bestimmter Zeitabschnitte verglichen wurde. Die statistische Signifikanz wurde mit den Zahlen der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

n.s. = statistisch nicht signifikant unterschieden

Vorbe- hdlg.	900 R		3/6 ALS+900 R		6/3 ALS+900 R		3/3 ALS+900 R	
	10.-60.	10.-180.	10.-60.	10.-180.	10.-60.	10.-180.	10.-60.	10.-180.
700 R	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
3/3 ALS+ 700 R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
6/3 ALS+ 700 R	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. XV: Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes, wobei das chimäristische Verhalten der Tiere aus den Gruppen der Versuchsreihe III mit den Ergebnissen bei den Gruppen der Versuchsreihe I innerhalb bestimmter Zeitabschnitte verglichen wurde. Die statistische Signifikanz wurde mit den Zahlen der maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

n.s. = statistisch nicht signifikant unterschieden

Die in den Tabellen XIV und XV wiedergegebenen Ergebnisse des Chi-Quadrat-Testes belegen statistisch, daß ein Teil der Strahlendosis durch ALS ersetzt werden kann. Während Tiere, die nur mit einer Ganzkörperbestrahlung von 700 R immunsuppressiv behandelt waren, sich in ihrem chimäristischen Verhalten von Tieren der Versuchsreihen I und II mit hoher Signifikanz unterscheiden, konnte statistisch kein Unterschied zwischen ALS-vorbehandelten und mit 700 R bestrahlten Tieren und Tieren, die mit 900 oder 800 R oder auch zusätzlich mit ALS vorbehandelt waren, festgestellt werden. Dies bedeutet, daß nach ALS-Applikation die Strahlendosis von 900 oder 800 R auf 700 R gesenkt werden kann.

Für die ALS-Applikation konnte statistisch kein Kondtionierungsschema ermittelt werden, das der von Rössler (27) angegebenen Konditionierung nach dem Muster 3 Tage ALS - 3 Tage Pause überlegen war.

Gewichtsverlauf und Mortalität innerhalb der einzelnen Gruppen nach der Transplantation lassen - abgesehen von wenigen Tieren der Versuchsreihe II - die Entwicklung einer akuten oder chronischen graft-versus-host-Reaktion unwahrscheinlich erscheinen.

Diskussion

In den letzten Jahrzehnten haben intensive Untersuchungen zahlreicher Laboratorien im In- und Ausland zur Klärung wichtiger Probleme der Transplantatabstoßung sowie der Möglichkeiten einer erfolgreichen Transplantation von fremdem Gewebe geführt, die in ihren Grundzügen auch auf die Übertragung von Knochenmark anwendbar sind. Zwar sind noch eine Vielzahl von Fragen offengeblieben, doch konnten in den letzten Jahren entscheidende Erkenntnisse durch Tierversuche gewonnen werden. Dabei handelt es sich in der Hauptsache um zwei Entdeckungen, die die Grundlage für alle späteren Versuche, Fremdgewebe zu übertragen, darstellen:

- 1) Die Abstoßung fremden Gewebes beruht auf der genetischen Unterschiedlichkeit zwischen Spender und Empfänger.
- 2) Die Vorgänge um die Abstoßung übertragenen fremden Gewebes sind immunologischer Natur; maßgebend daran beteiligt sind immunologische Reaktionen vom zellulären Typ.

Im folgenden sollen einige der Literatur entnommene Ergebnisse von Untersuchungen der Immungenetik und die Vorstellungen von der Immunantwort nach dem derzeitigen Stand erörtert, die bisher durchgeführten immunsuppressiven Möglichkeiten zusammengefaßt und die in den eigenen Versuchen gewonnenen Ergebnisse diskutiert werden.

I Immungenetik

Eine gezielte immungenetische Untersuchung war erst möglich, nachdem hochingezüchtete Mäusestämme zur Verfügung standen. Little und seine Mitarbeiter konnten bereits in den frühen 40er Jahren mit Hilfe von Transplantationen innerhalb von Inzuchtstämmen sowie zwischen verschiedenen ingezüchteten Stämmen von Mäusen Gesetze aufstellen, deren Gültigkeit später durch genauere Methoden bestätigt werden konnte. Drei der wichtigsten Erkenntnisse von Little waren:

- 1) Transplantate innerhalb eines Inzuchtstammes waren erfolgreich.
- 2) Transplantate zwischen Tieren aus unterschiedlichen Inzuchtstämmen wurden vom Empfänger abgestoßen.
- 3) Transplantate auf F_1 -Hybride zweier Inzuchtstämme gingen an, umgekehrt wurden sie abgestoßen.

Die Verträglichkeit fremden Gewebes, die Histokompatibilität, läßt sich in einem verhältnismäßig einfachen Test untersuchen. Dabei wird dem Empfängertier ein kleines Stück Spenderhaut transplantiert und das Transplantat in bestimmten Zeitabständen kontrolliert (Technik bei Mäusen vgl. 28). Neben dieser überaus empfindlichen Methode läßt sich die Abstoßung fremden Gewebes auch mit Hilfe von Tumortransplantationen aufzeigen. Die schnelle Proliferation des Tumorgewebes läßt diese Methode besonders geeignet erscheinen.

Für das Verständnis der Genetik bei Gewebstransplantationen

ist die Untersuchung der Elternstämme, der F_1 -Hybride, der Hybride aus der zweiten Generation und der durch die Rückkreuzung entstehenden Stämme hinsichtlich der Toleranz gegenüber Transplantaten wichtig. Durch intensive Kreuzung und Selektion ließen sich sog. kongene Stämme züchten, d.h. Stämme, die sich nur hinsichtlich eines einzigen Gens unterscheiden und gegenseitig transplantiertes Gewebe abstoßen. So ließ sich beweisen, daß für die Abstoßung histoinkompatiblen Gewebes nur wenige Gene, die sog. Histokompatibilitätsgene, verantwortlich sind. Die auf diese Weise ermittelten Gene wurden auch als H-Gene bezeichnet und durchnummeriert. Kongene Stämme, die transplantiertes Gewebe nicht abstießen, mußten zwangsläufig hinsichtlich ihrer H-Gene identisch sein, obwohl sie bezüglich anderer Gene nicht kongruent sein konnten. Snell (29), auf den entscheidende Ergebnisse zurückgehen, konnte insgesamt 12 derartige Gene beschreiben, er vermutete aber wesentlich mehr. Weiterhin konnte Snell nachweisen, daß bei weitem nicht alle Histokompatibilitätsgene zu einer schnellen und starken Abstoßung des Transplantats führten, sondern daß für die Auflösung einer Transplantatabstoßung die Unterschiedlichkeit im Histokompatibilitätsgen 2 zwischen Spender und Empfänger von entscheidender Bedeutung ist. In einem g.v.h.-Versuch konnte Cantrell (30) die unterschiedlich starke immungenetische Barriere verschiedener Histokompatibilitätsgene zeigen.

Eine starke Histoinkompatibilität beruht somit auf einer Differenz im H2-locus; man bezeichnet ein solches System als H2-inkompatibel. Eine Aufschlüsselung des H2-locus ergab, daß nur bestimmte Regionen innerhalb des H2-locus für die starke immungenetisch bedingte Transplantatabstoßung verantwortlich sind. Klein (31) zeigte dies für die Ir-Region des H2-Komplexes.

Endprodukte der Histokompatibilitätsgene sind Alloantigene, die im Empfängertier eine Immunreaktion auslösen. Allgemein wurde bisher angenommen, daß H-loci entweder ein Protein erzeugen, das der Zellmembran aufgelagert ist, oder - was wahrscheinlicher ist - das in die Zellmembran von Körperzellen eingebaut ist und daher vom Empfänger als nicht körpereigen erkannt wird.

Histokompatibilitätsgene, bzw. Zellmembraneigenschaften, für die sie verantwortlich sind, können aber nicht nur durch Züchtung kongener Stämme und Transplantation von Haut oder schnell proliferierendem Tumorgewebe näher definiert werden. Eine besonders elegante Methode beschrieben Gorer und seine Mitarbeiter bereits 1949. Ihnen gelang es, im Kaninchen Antikörper gegen das H2-Antigen der Maus zu provozieren. Der Nachweis immungenetischer Differenzen kann grundsätzlich mittels derartiger Antiseren bestimmt werden. Die Durchführung der Bestimmung kann in vitro im Hämagglutinationstest erfolgen. Somit ergänzen sich die Züchtung kongener Stämme und die Herstellung spezifischer Antiseren in hervorragender Weise.

Gleichzeitig mit der schrittweisen Klärung der Immun-genetik stellte sich das Problem der Immunantwort bei Transplantation von H2-inkompatiblen Gewebe sowie die Frage nach einer möglichen Unterdrückung des komplexen Geschehens.

II Immunantwort

Bei Transplantation von fremdem Gewebe vom Spendertier auf das Empfängertier werden die Transplantate innerhalb kurzer Zeit abgestoßen. Für die Transplantation H2-inkompatibler hämopoetischer Zellen kann eine Zeitspanne von ungefähr 10 bis 30 Tagen angenommen werden. Die Vorgänge um die Abstoßung fremder Zellen sind bis heute erst in Grundzügen bekannt, von einer genauen Schilderung ihrer Abläufe sind wir noch weit entfernt.

Die entscheidende Bedeutung bei der Abstoßungsreaktion kommt den kleinen Lymphozyten zu. Dies konnten Billingham, Brent und Medawar in einer bahnbrechenden Arbeit (32) beweisen. Sie injizierten einer gegen ein homologes Hauttransplantat toleranten Maus Lymphozyten eines nicht toleranten Tieres desselben Stammes und beobachteten eine rasche Abstoßung des Hauttransplantats.

Weitere Untersuchungen an den Lymphozyten ergaben, daß es mindestens zwei Lymphozytenpopulationen gibt. Während für die Ausbildung der einen Gruppe der Thymus von Be-

deutung zu sein scheint, entwickelt sich die andere lymphatische Reihe offenbar ohne Einfluß der Thymus. Huhn u.a. (33) gelang die Unterscheidung der beiden Lymphozytenpopulationen mit peroxydasemarkierten Antisera bei der Maus, da hier die beiden Zelltypen auf ihren Zellmembranen eine unterschiedliche Antigenstruktur besitzen. Ursprung der thymusunabhängigen Lymphozyten ist wahrscheinlich das Knochenmark, in ihrer weiteren Entwicklung differenzieren sie sich zu Plasmazellen, die für die humorale Immunantwort mitverantwortlich sind. Für die thymusabhängigen Zellen, die sog. T-Lymphozyten, läßt sich der Ursprungsort noch nicht mit letzter Sicherheit angeben, jedoch weisen auch hier viele Versuchsergebnisse auf das Knochenmark hin. So konnte Douglas (34) bei der Ratte den Nachweis erbringen, daß immunologisch kompetente Lymphozyten ihren Ursprung im Knochenmark haben.

Die kleinen Lymphozyten selbst sind nicht teilungsfähig; kommen sie in Kontakt mit Material, das einen Antigencharakter aufweist, so wandeln sie sich in den ihnen am nächsten liegenden lymphatischen Organen, den regionalen Lymphknoten, in große sog. pyrinophile Zellen (blast cells) um, die nun nach Teilung Träger möglicher zellgebundener Antikörper sind. Somit sind die zirkulierenden kleinen Lymphozyten nur Vorläuferzellen der eigentlichen aktiven Immunozyten, die dann an Ort und Stelle eine Immunreaktion auslösen. Die Erkenntnisse der

Umwandlung der zirkulierenden kleinen Lymphozyten gehen auf Mitchell und Miller (35) zurück, die dies tierexperimentell nachweisen konnten. Die Reaktion der regionären Lymphknoten nach Kontakt eines Lymphozyts mit einem in den Organismus eingedrungenen Antigen läßt sich mit der von Burnett aufgestellten Klon-Selektions-Theorie erklären, wonach innerhalb des lymphatischen Gewebes nach Rückkehr dieses Lymphozyts ein bestimmter Zellklon mit der Produktion antikörperbeladener Lymphozyten beginnt, die sich nun spezifisch gegen das eingedrungene Antigen wenden. Diese ausserordentlich ökonomische Reaktion des lymphatischen Systems ermöglicht eine starke und zielgerichtete Abwehr eingedrungener Antigene.

Weder die Umwandlung der kleinen Lymphozyten in die "blast-cell"-Form noch die Wirkung der durch die Teilung entstehenden antikörperbeladenen, kleinen Lymphozyten sind bekannt. Sicher aber ist, daß diese immun-kompetenten Zellen die Gegend des Transplantats massiv infiltrieren und zur endgültigen Abstoßung des transplantierten Gewebes führen. Möglicherweise gehen die aktivierten Lymphozyten beim Kontakt mit dem Antigen zugrunde und setzen dabei proteolytische Fermente frei, die ein Angehen des Transplantats verhindern bzw. seine Abstoßung einleiten.

In bezug auf die Transplantation hämopoetischer Zellen bedeuten die Forschungsergebnisse von Billingham und

Mitchell, daß nicht nur der Empfänger mittels seiner Lymphozyten gegen die Spenderzellen reagieren kann, sondern daß auch mitübertragene immunkompetente Zellen des Spenders eine Immunreaktion gegen den Empfänger auslösen können. Diese Gefahr ist bei der Übertragung von Zellen einer Milzsuspension wesentlich größer als nach Übertragung von histoinkompatiblem Knochenmark, da Milzzellsuspensionen einen wesentlich höheren Anteil an immunkompetenten Zellen enthalten als Knochenmarksuspensionen.

Demgemäß ist die Stärke der Immunreaktion des Empfängers gegen den Spender und umgekehrt von der Zahl der vorhandenen immunologisch aktiven kleinen Lymphozyten abhängig. Clamann (36) konnte dies an Hand von Transplantationen von Mischungen aus Knochenmark und Thymuszellen zeigen.

Damit wird verständlich, warum eine Transplantation von histoinkompatiblen hämopoetischen Zellen erst dann erfolgreich sein kann, wenn sowohl die immunkompetenten Zellen des Empfängers als auch die des Spenders eliminiert sind. Dieser Vorgang wird als Immunsuppression bezeichnet und stellt heute die zentrale Problematik der gesamten experimentellen Transplantationsforschung dar.

III Immunsuppression

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von Methoden zur Unterdrückung der durch die kleinen Lymphozyten bedingten Immunantwort des Empfängers nach Transplantation fremden histoinkompatiblen Gewebes entwickelt werden. Da der Ursprung der für die Abstoßungsreaktion wichtigen T-Lymphozyten nach wie vor nicht geklärt ist und die Forschungen über den Weg dieser Zellen bis zu ihrer endgültigen Reifung voraussichtlich in absehbarer Zeit nicht abgeschlossen sein werden, kann eine wirksame Immunsuppression bisher nur durch selektive Eliminierung der kleinen aktiven Immunozyten erreicht werden. Dabei ist ein Mittel umso besser geeignet, je weniger es auch andere lebenswichtige Organe des Empfängers in ihrer Funktion beeinträchtigt. Besonders gefährdet erscheinen in diesem Zusammenhang neben den Zellen der Hämpoese auch Zellen des lymphatischen Systems, die nicht für die Immunreaktionen vom zellulären Typ verantwortlich sind, sondern deren Aufgabe in der Produktion von Antikörpern besteht, und die somit einen maßgeblichen Einfluß auf die Infektabwehr des Empfängers haben. Es war daher ein Ziel der zahlreichen Forschungsarbeiten, Wege zu erarbeiten, die ausschließlich eine Unterdrückung der h.v.g. über die selektive Eliminierung der immunkompetenten Zellen, der T-Lymphozyten, zur Folge haben.

1. Thymektomie

Entwicklungsgeschichtlich ist der Thymus mit Sicherheit das erste lymphatische Organ. Die Entwicklung sämtlicher anderer lymphatischer Systeme des Organismus scheint thymusabhängig zu sein. Ob der Thymus Ursprung der kleinen Lymphozyten ist, blieb bisher ungeklärt. Viele Untersuchungen sprechen - zumindest beim ausgewachsenen Organismus - dagegen und deuten eher auf das Knochenmark als eigentlichen Ursprung der zirkulierenden Zellen des lymphatischen Systems hin (34).

Dennoch kommt dem Thymus eine zentrale Bedeutung in der Entwicklung des Immunapparates zu. Die Funktion und die Bedeutung des Thymus wurden bei Nagetieren untersucht. Parrot und Delphine (37) konnten thymusabhängige Zonen im lymphatischen Gewebe neugeborener Mäuse feststellen. Auf welche Weise der Thymus die Proliferation des lymphatischen Gewebes induziert, blieb lange Zeit ungeklärt. Osoba (38) nahm dafür einen humoralen Faktor auf Grund seiner an thymektomierten Mäusen durchgeführten Versuche an. Weissmann (39) konnte bei neugeborenen Tieren 1967 eindeutig Lymphozyten nachweisen, die, vom Thymus erzeugt, in die Peripherie abwanderten; für die Entwicklung des lymphatischen Systems gab jedoch auch er einen humoralen Faktor an. Einen chromosomalen Nachweis für die Migration von Thymozyten in die Peripherie konnte 1968 Denman (40) führen. Weissmann konnte in seiner Arbeit ferner nachweisen, daß bei neugebo-

renen Tieren der Anteil an Thymozyten wesentlich größer war als der Anteil an Lymphozyten, die von peripheren lymphatischen Organen produziert wurden. Beim erwachsenen Tier ist nach seinen Versuchsergebnissen das Verhältnis umgekehrt; hier überwiegen die von peripheren lymphatischen Organen hergestellten Lymphozyten bei weitem. Offenbar wird die Produktion von Thymozyten durch den hohen Anteil an peripher erzeugten Lymphozyten gebremst. Der Wandel der Produktionsstellen der Lymphozyten erklärt, warum thymektomierte erwachsene Tiere nur geringfügig in ihrer Immunantwort geschädigt wurden, während neugeborene Tiere durch eine Thymektomie eine erhebliche Senkung ihrer Lymphozyten erfuhren und so starke Immundefekte erlitten, daß sie lebensunfähig waren (41). Erwachsene thymektomierte Tiere waren durchaus in der Lage, auf ein gewebsunverträgliches Transplantat eine deutliche Immunantwort zu geben (42). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte Jeejeebhoy (43), der erwachsene Ratten thymektomierte und sie hinsichtlich ihrer Fähigkeit, auf Antigenreize eine Immunantwort zu geben, untersuchte. Dabei konnte Jeejeebhoy beobachten, daß die Fähigkeit der Tiere, eine Immunantwort auf Schaeferythrozyten zu geben, unverändert war und auch über Monate unverändert blieb. Auch die Abstoßung von Hauttransplantaten verlief ohne Verzögerung; jenseits des 120. Tages konnte sogar noch eine gesteigerte Abstoßungsreaktion beobachtet werden.

Allen vorerwähnten Versuchen war zu entnehmen, daß eine Thymektomie beim erwachsenen Tier eine Immunsuppression nicht erzeugen kann und somit für eine Vorbereitung des Empfängers für ein Transplantat nicht in Frage kam.

Miller (44) konnte jedoch nachweisen, daß der Thymus für die Regeneration des Immunsystems nach einer weitgehenden Zerstörung des lymphatischen Systems von entscheidender Bedeutung ist. Eine derartige Aplasie des lymphatischen Systems läßt sich mit Hilfe ionisierender Strahlen erreichen. Miller transplantierte thymektomierte, letal bestrahlte Tiere mit syngenen Knochenmark und beobachtete, daß so vorbehandelte Tiere ausserordentlich waren, auf Schafererythrozyten eine Immunantwort zu geben oder allogene Hauttransplantate abzustossen.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Die Bedeutung des Thymus liegt in der frühen Entwicklungsphase des lymphatischen Systems. Thymektomien zu dieser Zeit rufen eine schwere Immundefizienz hervor. Thymektomien beim erwachsenen Tier schwächen nicht die Fähigkeiten des Tieres, eine Immunantwort auf einen spezifischen Antigenreiz zu geben. Beim erwachsenen Tier liegt die Bedeutung des Thymus bei der Regeneration des zerstörten lymphatischen Systems. Es erscheint dabei nicht ausgeschlossen, daß in diesem Fall das lymphatische System in den neonatalen Zustand zurückversetzt wird und nur

durch den Thymus wieder aufgebaut werden kann.

2. Drainage des ductus thoracicus

Die kleinen Lymphozyten gelangen von ihrem Ursprungs-ort wahrscheinlich über die Blutbahn in die Periphe-rie des Organismus, können die kleinen Blutgefäße dort verlassen und bewegen sich nun in den Lymphspalten wieder zunächst in Richtung auf die kleinen Kanäle des lymphatischen Systems, die sich zentral im ductus tho-racicus vereinigen, der in den venösen Schenkel der Blutbahn mündet.

Eine Möglichkeit, die Zahl der Lymphozyten im Blut entscheidend zu senken, bietet eine Drainage des duc-tus thoracicus, wo die Lymphozyten in starker Konzen-tration zum Blut zurückzirkulieren.

Woodruff (45) konnte 1963 durch Anlegen einer Fistel an den ductus thoracicus bei Ratten eine starke Sen-kung der Lymphozyten, gemessen im peripheren Blut, her-beiführen. Durch Verringerung der Zahl der Lymphozyten um fast die Hälfte konnte die Abstoßung allogener Haut-transplantate um 14 Tage hinausgeschoben werden. Bei weiteren Versuchen kombinierte Woodruff die Drainage mit der Gabe von ALS und konnte damit die Toleranz ge-genüber allogenen Hauttransplantaten auf 35 Tage erwei-tern.

Jedoch ist die technische Handhabung dieser von Woodruff zur Immunsuppression beschriebenen Methode schwierig, so daß sie keinen Eingang in die jüngeren Arbeiten finden konnte.

3. Zytostatika

Zytostatika, häufig angewendet zur Unterdrückung maligne entarteten Zellwachstums, haben als Nebenwirkung eine starke Suppression von Zellproliferationen der myeloischen und der lymphatischen Reihe. Diese Wirkung auf das Knochenmark und das lymphatische System beruht offenbar darauf, daß sich Zellen der myeloischen und gegebenenfalls der lymphatischen Reihe - ähnlich wie die maligne entarteten Zellen - häufiger als andere Zellen des Organismus teilen. Für die lymphatische Reihe gilt dies insbesondere dann, wenn ein Antigen in den Organismus eingedrungen ist und die Zellen des lymphatischen Apparates zu starker Proliferation angeregt werden.

Die Nebenwirkungen der Zytostatika konnten in einigen Präparaten zu Hauptwirkungen gemacht werden, dabei handelt es sich insbesondere um alkylierende Substanzen. Diese Substanzen hemmen die Funktion und die Synthese der Desoxyribonucleinsäure, greifen also am Zellkern selbst an. Sie verhindern somit die Zellproliferation schlechthin.

Eingang in die immunsuppressive Behandlung fanden vor allem Cyclophosphamid und Busulfan. Dabei besteht grundsätzlich die Möglichkeit, zu einer Unterdrückung der zellulären und auch der humoralen Immunantwort zu gelangen.

Deutliche Erfolge hinsichtlich der gewonnenen Immunsuppression konnten verschiedentlich gemacht werden (46, 47). Jedoch besitzen die genannten Verbindungen starke Nebenwirkungen, die für den ohnehin geschwächten Empfänger zu schweren Komplikationen werden können, so daß eine klinische Verwendung einer strengen Indikation bedarf.

4. Corticosteroide

Die immunsuppressive Wirkung von Hormonen der Nebennierenrinde sei hier nur am Rande erwähnt, da diese Mittel seit langem zur Unterdrückung immunbedingter allergischer Reaktionen in der Klinik eingeführt sind. Die alleinige Anwendung von Corticosteroiden zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion eines Transplantatempfängers ist nicht möglich, in Kombination mit anderen immunsuppressiven Maßnahmen haben sich aber die Nebennierenrindenhormone durchaus bewährt. Jedoch beeinträchtigen hochdosierte Gaben von Corticosteroiden auf Grund ihrer Nebenwirkungen den Organismus stark.

5. Ionisierende Strahlen

Nach wie vor kommt für die zelluläre und humurale Immunsuppression vor allem die Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen als ein besonders wirksames Mittel in Betracht. Für die durchgeführten Versuche ist die Ganzkörperbestrahlung zusätzlich unumgänglich, um innerhalb des Knochenmarkstromas des Empfängers Raum für die Proliferation der Spenderzellen zu schaffen.

Ionisierende Strahlen verursachen eine Elektronenverschiebung, die als Photoeffekt bezeichnet wird. Auf lebendes Gewebe gerichtet bewirken sie physikalische, chemische, biologische und physiologische Veränderungen (48), wodurch einerseits die Proliferation lebenden Gewebes gehemmt und zum anderen ruhendes Gewebe zerstört werden kann.

Hämo-poetische Zellen sind ebenso wie Zellen des lymphatischen Systems ausgesprochen strahlensensibel. Nach einer Ganzkörperbestrahlung mit ionisierenden Strahlen mit einer Gesamtdosis von 500 bis 600 R sterben 50% der bestrahlten Mäuse an einer strahlenbedingten Aplasie des Knochenmarks, die durch eine ektopische Blutbildung nicht kompensiert werden kann (5). Erhöht man die Strahlendosis auf 900 bis 1000 R, so sterben alle bestrahlten Tiere innerhalb kurzer Zeit (6). Eine Kompensation der strahlenbedingten Knochenmarksaplasie ist nicht mehr durch eine ektopische Blutbildung

möglich, die Tiere können dauerhaft nur durch Transplantation von syngenen Knochenmark gerettet werden.

Van Bekkum (20) konnte zeigen, daß bis zu einer Gesamtstrahlendosis von 1200 R größtenteils Zellen des hämopoetischen Systems zerstört werden. Dabei erwiesen sich Zellen der lymphatischen Reihe ebenfalls als strahlensensibel. Einen Nachweis hierfür konnte Ledney (49) in einem g.v.h.-Versuch erbringen, indem er eine allogene Milzzellsuspension vor der Transplantation mit mäßigen Strahlendosen zur Eliminierung von aktiven Immunozyten bestrahlte. Die Ergebnisse ließen vermuten, daß die Lymphozyten zu den strahlensensibelsten Zellen überhaupt zu rechnen sind.

Dennoch läßt sich eine h.v.g.-Reaktion nicht durch ionisierende Strahlen allein unterdrücken. Van Bekkum (50) beschrieb, daß sich durch eine supraletale Ganzkörperbestrahlung zwar der größte Teil des lymphatischen Gewebes zerstören läßt, daß aber auch einige wenige strahlenresistente immunkompetente Zellen überleben können. Diese Zellen könnten dann zur Auslösung einer Immunreaktion gegen das Transplantat aktiv werden. Rössler (27) konnte im Lymphknotengewichtsversuch bei Mäusen den Nachweis erbringen, daß auch bei Strahlendosen von 1200 R eine deutliche Immunantwort auf histoinkompatibles Gewebe im Sinne einer h.v.g.-Reaktion gegeben werden kann.

Eine Unterdrückung der humoralen Immunantwort mit relativ kleinen Strahlendosen konnte Gottlieb (51) im Tierversuch nachweisen.

Ionisierende Strahlen vermögen somit die humorale und die zelluläre Immunantwort von Mäusen bis zu einem bestimmten Grad zu unterdrücken, jedoch läßt sich eine absolute Immunsuppression - das zeigen insbesondere die Versuchsergebnisse von Rössler (27) - auch durch eine starke Erhöhung der Gesamtstrahlendosis nicht erreichen. Hinzu kommt, daß durch eine Erhöhung der Dosis ionisierender Strahlen über 1000 R zunehmend auch andere Organe der Tiere geschädigt werden (20), wodurch das Leben der Tiere stark gefährdet ist. Dies gilt vor allem für die Strahlensyndrome von seiten des Gastrointestinaltraktes, die in jedem Fall für die Tiere tödlich sind.

Die Immunsuppression durch ionisierende Strahlen, die für Knochenmarktransplantationen im H2-inkompatiblen System jedoch nicht ausreichend ist, um dauerhafte Chimären zu schaffen, sowie die schädigende Wirkung von Strahlen auf den Organismus machen es erforderlich, nach weiteren immunsuppressiven Mitteln zu suchen und diese auf ihre Wirksamkeit hin im Tierversuch zu testen.

6. Antilymphozytenserum

Die Entwicklung von Seren, die sich gegen Blutbestand-

teile richten, geht auf das Ende des letzten Jahrhunderts zurück. 1899 stellte Metchnikoff (52) als erster ein Antiserum her. Intraperitoneal gespritzte hämopoetische Zellen einer Tierart provozierten im Meerschweinchenversuch die Erzeugung von Antikörpern, die agglutinierende und hämolysierende Eigenschaften besaßen und Leukozyten vernichteten. Besredka (53) konnte bei seinen Versuchen feststellen, daß sich dieser cytotoxische Effekt der Seren durch Erhitzen auf 56°C aufheben ließ. Christian und Leen (54) produzierten eine Reihe von Antiseren, die sich hauptsächlich gegen weiße Blutkörperchen richteten, aber auch einen hämolytischen Charakter zeigten. Pappenheimer (55) gewann Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen mit Thymuszellen und präpariertem lymphatischen Gewebe. Versuchen in vitro folgten Versuche in vivo, bei denen Flexner (56) histologisch deutliche Veränderungen am lymphatischen Gewebe neben einer starken peripheren Verminderung von Zellen aus der weißen Reihe feststellen konnte. Einen Lymphozytensturz für 40 Stunden konnten Chew und Lawrence (57) bereits nach einer Injektion ihres Antilymphozytenserums bei Meerschweinchen beobachten. Wiederholte Injektionen führten zu einer Lymphopenie, die 10 Tage anhielt.

Die Herstellung und Verwendung heterologer Antilymphozytenserum fand vor Entdeckung der Bedeutung der Lymphozyten bei immunologischen Reaktionen, insbesondere

nach Übertragung fremden Gewebes, keine größere Beachtung. Erst als es galt, die Abstoßung fremden Gewebes zu verhindern, und nun speziell gegen aktive Immunozyten gerichtete Seren angeboten werden konnten, begann eine intensive Forschung, die tierexperimentell die klinische Anwendung vorbereiten sollte.

Die ersten Versuche, heterologes Antilymphozytenserum zur Unterdrückung einer Abstoßungsreaktion zu verwenden, gehen auf Woodruff (58) zurück, der nach Versuchen in vitro 1961 den Empfänger vor Transplantation mit Antilymphozytenserum konditionierte. Diese Versuche sowie Versuche von Waksman (59), immunologische Reaktionen vom verzögerten Typ zu unterdrücken, waren zwar anderen immunsuppressiven Mitteln überlegen, jedoch auf längere Sicht ohne nennenswerten Erfolg. Woodruff und Anderson (45) erzielten 1963 bei Ratten eine Verlängerung der Toleranz gegenüber homolog transplantierte Haut durch eine kombinierte immunsuppressive Vorbehandlung, bestehend aus einer Drainage des ductus thoracicus des Empfängers sowie ALS-Applikation. Mitte der 60er Jahre gelang Sacks (60), eine anhaltende Lymphopenie bei Ratten durch eine tägliche Applikation von heterologem Antilymphozytenserum zu erzeugen. Gray (24), Monaco (61) und Russel (62) konnten in Mäusen einen starken lymphopenischen Zustand durch ALS-Applikation herstellen. Während Monaco dabei zusätzlich eine Verlängerung gegenüber Hauttransplantaten zeigen konnte, bewies Russel darüber hinaus, daß

ALS auch zu einem Sistieren der Antikörperproduktion gegen Schafererythrozyten führt. Nagaya und Sieker (63) konnten ebenfalls bei Ratten einen deutlich persistierenden Effekt des ALS hinsichtlich der Verminderung von Lymphozyten erzielen.

In den folgenden Jahren führten dann schließlich auch bei anderen Tierspezies Versuche zur Unterdrückung einer host-versus-graft-Reaktion durch ALS zum Erfolg. So gelang Pichlmayr (64), Abaza (65) und Monaco (66), eine deutliche Toleranzverlängerung gegenüber homolog transplantierten Nieren durch ALS-Konditionierung des Empfängers zu erzielen. Pichlmayr konnte darüber hinaus beobachten, daß sich nach einer intravenösen Applikation von ALS eine Lymphopenie innerhalb weniger Minuten einstellt (67). Über einen erfolgreichen Versuch, bei Rhesusaffen ein Anwachsen von transplantiertem Knochenmark und eine Verlängerung der Persistenz des fremden hämopoetischen Systems durch ALS-Konditionierung des Empfängers zu erreichen, berichtet Prinsen (68) 1970.

Medawar bezeichnete das Antilymphozytenserum als das immunsuppressivste Agens schlechthin. Ursache der verzögerten Abstoßung übertragenen fremden Gewebes, also der deutlichen Immunsuppression, ist nicht, wie ursprünglich angenommen, eine kompetitive Hemmung sensibler Zentren auf der Lymphozytenmembran durch Antikörper der verwendeten Seren, die blind folding coating bezeichnet wurde (69), sondern die massive zytotoxi-

sche Wirkung des ALS auf die immunkompetenten Zellen, die in Form einer starken Lymphopenie peripher nachweisbar ist (67). Levey (70) vermutete, daß Lymphozyten durch ALS über mehrere Generationen unfähig sind, auf spezifische Antigenreize eine Immunantwort zu geben, und sah dies ebenfalls als Gegenbeweis für die Hypothese des blind folding coating der Lymphozytenmembran durch ALS-Antikörper an.

Die Untersuchungen der letzten Jahre bezüglich der Wirkungen von heterologen Antilymphozytenserum konzentrierten sich hauptsächlich auf drei Fragen:

- 1) In welchem Maß eliminiert ALS die immunkompetenten Zellen ?
- 2) Können immunkompetente Zellen in allen Organen des Körpers von ALS erreicht werden ?
- 3) Inwieweit werden ausser den Zellen der lymphatischen Reihe auch Zellen des hämopoetischen Systems durch Kreuzreaktionen geschädigt ?

Die Eliminierung von Immunozyten, d.h. von kleinen aktiven Lymphozyten, ist Hauptaufgabe des Antilymphozytenserums. Durch Kreuzreaktionen können aber auch andere Zellen und Systeme vernichtet oder ihre Proliferation zumindest teilweise eingeschränkt werden.

Lance (71) konnte 1968 den zytotoxischen Effekt von ALS auf rezirkulierende kleine Lymphozyten bestätigen. Denman kam grundsätzlich zu ähnlichen Ergebnissen, konnte aber zusätzlich nachweisen, daß ALS kleine, langle-

bige Lymphozyten stärker eliminiert, die später durch kleine, kurzlebige Lymphozyten repopularisiert werden (72). Weiterhin gelang Denman der Nachweis, daß die Thymusdrüse nur gering ALS-gängig ist. Denman benutzte dazu einmal den Thymusgewichtsversuch (73), zum anderen eine Immunfluoreszenzmethode (74). Taub (75) kam bei seinen tierexperimentellen Untersuchungen zu ähnlichen Resultaten und berichtete 1968, daß Lymphozyten, die sich innerhalb des lymphatischen Gewebes befinden von ALS unbeeinflußt bleiben. Durch die vorerwähnten Versuche wurden die Ergebnisse von Turk (25) bestätigt, der erst mit einem Antithymozytenserum neben einem deutlichen zytotoxischen Effekt in der Peripherie auch zu einer deutlich meßbaren zentralen Lymphopenie in thymusabhänigem Gewebe gelangte.

Ausser diesen starken zytotoxischen Wirkungen des Anti-Lymphozytenserums konnten in den letzten Jahren noch weitere starke zytotoxische Wirkungen des ALS nachgewiesen werden. So kommt es neben der Unterdrückung der Immunantwort vom zellulären Typ auch zu einer deutlichen Unterdrückung der humoralen Abwehr. Ferner konnte 1967 James (76) die Ausbildung von Antikörpern gegen injiziertes Fremdeiweiß durch ein Anti-Ratten-Lymphozytenserum unterdrücken.

Von großer Bedeutung, insbesondere im Hinblick auf Transplantationen homologen und heterologen Knochenmarks, sind mögliche Kreuzreaktionen des ALS mit Zellen der

myeloischen Reihe. De Meester (77) konnte bei seinen Versuchen sowohl in vitro als auch in vivo eine extensive Zellysis in bezug auf alle Zellen des hämopoetischen Systems mit besonderer Bevorzugung von Zellen der weißen Reihe feststellen. Besonders empfindlich - so postulierte De Meester - waren dabei die Stammzellen. Thierfelder (78) konnte ebenfalls 1968 diese extensive Zellysis beobachten und im ALS nicht nur Antikörper gegen Zellen der weißen Reihe feststellen sondern auch gegen Erythrozyten, Thrombozyten sowie gegen Leber- und Nierenparenchymzellen. An Hand von Knochenmarkausstrichen konnte die Wirkung des ALS auf myeloische Proliferationszentren untersucht werden. Thierfelder u.a. (79) stellten dabei fest, daß neben einer ausgeprägten Lymphopenie eine starke Erythroblastopenie als Folge einer ALS-Behandlung auftrat. Daneben erschienen Zellen der myeloischen Reihe relativ vermehrt (80). Rodriguez (81) konnte diese Erkenntnisse an Hand von histologischen Knochenmarkpräparaten bestätigen und fand darüber hinaus Anhaltspunkte, daß unter ALS-Behandlung ein shift von Erythroblasten und Plasmazellen vom Knochenmark zur Milz stattfindet und somit eine ektopische Blutbildung eingeleitet wird.

Zusammenfassend läßt sich sagen: ALS bewirkt eine ausgeprägte periphere Lymphopenie und hat infolge von Kreuzreaktionen eine mäßig starke zytotoxische Wirkung auf Zellen des roten Blutbildes sowie auf Parenchymzellen. ALS vermag nicht oder nur geringfügig in lymphati-

sche Organe einzutreten.

Antikörper gegen Parenchymzellen lassen sich durch spezielle Absorptionsmethoden aus dem Serum eliminieren, so daß man auf diese Weise die reine Immunglobulinfraktion erhält, die sich nur noch gegen Lymphozyten wendet. Dennoch bereitet die Anwendung von Antilymphozytenglobulin weitere Schwierigkeiten, da sich die Gefahr einer Allergisierung nach wiederholter intravenöser Verabreichung nicht ausschließen läßt. Zusätzlich wirkt sich eine starke Immunsuppression auch auf die Abwehr von Infekten nachteilig aus. Diskutiert wird weiterhin eine mögliche Begünstigung von Tumorwachstum bei immunsupprimierten Empfängern (22). Derartige Beobachtungen machten Starzl und Mitarbeiter.

7. Kombination von immunsuppressiven Maßnahmen

Von großer Bedeutung für die Unterdrückung einer host-versus-graft-Reaktion nach homologer oder auch heterologer Gewebstransplantation ist die Kombination verschiedener immunsuppressiver Maßnahmen, da keine der bisher aufgeführten Immunsuppressiva allein eine Abstossungsreaktion zu verhindern vermag und alle bisher getesteten Möglichkeiten mit unerwünschten Begleiterscheinungen verbunden sind, sobald man die Mittel höher dosiert oder über längere Zeit verabreicht.

Auf die Kombination von ALS-Gabe und Drainage des ductus thoracicus, die Woodruff durchführte, wurde bereits

hingewiesen. Bedeutsam sind auch für eine starke Immunsuppression Kombinationen von ALS und Thymektomie (82). Levey (83) konnte eine Verbesserung der Immunsuppression durch eine der ALS-Gabe vorausgehende Thymektomie nicht erzielen, dagegen gelang ihm eine Verbesserung der Toleranz gegenüber homolog transplantierten Hauttransplantaten durch eine Kombination von ALS und Hydrocortison. Eine leichte Verbesserung erzielte auch Levey durch Kombination von ALS mit subletaler Bestrahlung. Eine deutlich verbesserte Immunsuppression gelang Bau und Thierfelder (23) im heterologen System nach immunsuppressiver Vorbehandlung der Empfänger durch eine letale Ganzkörperbestrahlung und ALS. Rössler (27) konnte die Überlegenheit einer aus Bestrahlung und ALS-Applikation bestehenden Vorbehandlung der Tiere gegenüber einer immunsuppressiven Monotherapie im sog. Lymphknotentest nachweisen. Dabei wurden im Anschluß an die immunsuppressive Vorbehandlung des Empfängers Zellen des Spendertieres in die Fußsohle injiziert. Die Proliferation des poplitealen Lymphknoten, gewichtsmäßig im Vergleich zur unbehandelten kontralateralen Seite erfaßt, stellte ein Maß der h.v.g. dar. Rössler konnte damit bestätigen, daß auch R-Dosen über 1000 R zu keiner dauerhaften Immunsuppression führen, während durch eine Kombination von ALS und Ganzkörperbestrahlung eine deutliche Unterdrückung des Empfängers auch noch bei 900 R erzielt werden kann.

IV Unterdrückung der graft-versus-host-Reaktion

Übertragung von hämopoetischen Zellen im H2-inkompatiblen System auf letal bestrahlte Tiere führt zu einer Reaktion mitübertragener immunkompetenter Zellen gegen den Empfänger und ruft in diesem das Krankheitsbild der secondary disease hervor. Cantor (84) zeigte an Hand seiner tierexperimentellen Untersuchungen, daß für die Stärke einer g.v.h.-Reaktion die Zahl der mitübertragenen Lymphozyten entscheidend ist. So konnte er durch Lymphozyten, gewonnen aus dem ductus thoracicus der Spender, im Empfänger eine sehr starke g.v.h.-Reaktion auslösen, während Milzzellsuspensionen in diesem Vergleich schwächer reagierten. Die geringste Aktivität der Immunozyten gegen den Empfänger zeigten Knochenmarksuspensionen. Die Entwicklung der g.v.h.-Reaktion konnte in vielen Spezies beobachtet werden und bedeutet auch für die klinische Knochenmarkübertragung ein entscheidendes Hindernis (85).

Da Knochenmarksuspensionen von Mäusen nur eine relativ geringe Anzahl immunkompetenter kleiner Lymphozyten enthält, resultiert daraus ein wesentlich protrahierter Verlauf der Erkrankung, so daß die Tiere etwa zwischen dem 30. und dem 60. Tag sterben. Sehr lange Verläufe einer chronischen g.v.h.-Reaktion sind nicht selten. Die Erkenntnis, daß die g.v.h.-Reaktion auf die kleinen Lymphozyten zurückgeht, konnten 1957 Billingham, Brent und Medawar nachweisen. Sie konnten bei neugebo-

renen Mäusen durch Injektion von homologen Milzzellsuspensionen ein der secondary disease ähnliches Bild, die sog. runt disease, hervorrufen.

Die Unterdrückung der g.v.h.-Reaktion war somit, ähnlich wie die Unterdrückung der h.v.g.-Reaktion, an die selektive Ausschaltung von Immunozyten gebunden. Demnach standen grundsätzlich dieselben Methoden zur Verfügung wie zur Unterdrückung des Abstoßungsvorgangs beim Empfänger. Lymphozyten sind strahlensensibel, jedoch bringt eine Bestrahlung der Zellsuspension eine Schädigung der hämopoetischen Zellen, insbesondere der Stammzellen, mit sich. Van Bekkum (86) konnte mit einer Lagerung der Spenderzellsuspension bei 4°C über einige Stunden Erfolge erzielen. Von großer Bedeutung wurde sehr bald die Anwendung von Antilymphozytenserum. Ledney (87, 88) behandelte die Spendertiere mit ALS, während andere Autoren eine Inkubation der Spenderzellsuspension zusammen mit ALS bevorzugten. Ledney (49) beschrieb eine Behandlung der Spendertiere mit ALS als geeignete Methode zur Verhinderung einer g.v.h.-Reaktion. Thierfelder (89) gelang eine Verzögerung des Sekundärsyndroms durch eine ALS-Spenderbehandlung im homologen System. Auf diese Weise ließen sich zwar akut oder chronisch verlaufende Sekundärkrankheiten verhindern oder hinauszögern; dennoch mußte bei der Vielzahl der Kreuzreaktionen des ALS mit anderen Zellen des hämopoetischen Systems mit großen Verlusten von Transplantatzellen gerechnet werden.

Eine selektive Eliminierung immunkompetenter Zellen aus den Zellsuspensionen gelang Rodt u.a. (26, 90) durch die Herstellung eines Kaninchen-anti-Mäusehirnzellen-Serums. Nach Eliminierung von Kontaminierungsantikörpern, die auch mit Stammzellen reagieren können, reagierte die gewonnene Serumfraktion nur noch gegen die kleinen Lymphozyten, die wie die Hirnzellen auf ihrer Zellmembran das Thetaantigen besitzen.

V Diskussion der eigenen Ergebnisse

Die Unterdrückung einer host-versus-graft-Reaktion nach der Übertragung H2-inkompatiblen Knochenmarks ist nach einer Vorbehandlung der Empfängertiere durch eine immunsuppressive Vorbehandlung, bestehend aus einer Kombinationsbehandlung von ALS-Applikation und Ganzkörperbestrahlung oder aus einer Bestrahlung allein, mit unterschiedlichem Erfolg gelungen.

Ein dauerhafter Chimärismus über den 200. Tag nach der Transplantation hinaus ließ sich in einem System erzielen, in dem die Empfängertiere nach einer mehr-tägigen ALS-Applikation mit 900 R ganzkörperbestrahlt wurden, bevor sie H2-inkompatibles Kno^hchenmark übertragen bekamen. Der Erfolg dieser Transplantation dürfte neben der starken cytotoxischen Wirkung des ALS und insbesondere dessen lymphozytotoxischer Wirkung (67, 70, 71) darauf beruhen, daß im lymphatischen Gewebe verbliebene immunkompetente Zellen sowie deren Vorläuferzellen durch die ionisierenden Strahlen vernichtet wurden. Zusätzlich wäre zu diskutieren, ob nicht eine derartig hohe Bestrahlung auch zu einer so starken Zerstörung des Thymusgewebes führt, wie Miller (44) sie beschreibt, so daß der Aufbau eines neuen Immunsystems mit empfangereigenen immunkompetenten Zellen nicht mehr möglich ist. Es entsteht also ein Zustand, der dem von neonatal thymektomierten Tieren entspricht, bei dem die Tiere so starke Immundefekte erlitten, daß sie le-

bensunfähig waren (41), der Aufbau des lymphatischen Systems kann sich nicht vollziehen. Die Bedeutung der Thymusdrüse für die Wiedergewinnung der immunologischen Aktivität der Tiere gegenüber Antigenreizen beschrieb Monaco (91). Ähnlich wie in den von Monaco beschriebenen Versuchsanordnungen und Versuchsergebnissen wäre bei den eigenen Versuchsergebnissen daran zu denken, daß der Thymus von ALS-vorbehandelten und mit 900 R bestrahlten Tieren seine Regeneration mit Hilfe der transplantierten Spenderzellen erhält und nun ein den Spenderzellen entsprechendes lymphatisches System aufbaut, das sich nicht mehr gegen die transplantierten Zellen wendet und somit einen dauerhaften Chimärismus ermöglicht.

Waren Tiere nur mit 900 R immunsuppressiv vorbehandelt, so entsprach ihr chimäristisches Verhalten nach der statistischen Aussage dem der ALS-vorbehandelten und bestrahlten Tiere. Dennoch muß daran gedacht werden, daß trotz einer hohen Dosis ionisierender Strahlen immunkompetente Zellen überleben (50) und zur Auslösung einer Immunreaktion führen können (27). So wurden auch bei dieser Versuchsreihe Tiere gefunden, die das Transplantat schon nach kürzerer Zeit abgestoßen hatten.

Für das chimäristische Verhalten der Tiere in den Versuchsreihen II, III, IV und V sind grundsätzlich dieselben Mechanismen einer möglichen Immunsuppression zu diskutieren wie bei Versuchsreihe I. ALS bewirkt dabei eine starke Reduktion peripherer Lymphozyten, während

eine Ganzkörperbestrahlung von 800 oder 700 R eine Schädigung des lymphatischen Gewebes nach sich zieht. Die statistische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse läßt den Schluß zu, daß für einen Zeitraum von ca. 100 Tagen nach der Transplantation von H2-inkompatiblem Knochenmark eine Erhöhung der Strahlendosis von 700 auf 800 oder 900 R keine Verbesserung der Immunsuppression mit sich bringt, sofern die Empfängertiere zusätzlich ALS erhalten. Dies bedeutet, daß schon durch Strahlen von 700 R eine Schädigung des lymphatischen Gewebes erzielt werden kann, die über eine längere Zeitdauer persistiert und zusammen mit der Ausschaltung peripherer immunkompetenter Zellen eine starke Immunsuppression zur Folge hat.

Der kurzzeitige Erfolg nach der Transplantation von Knochenmark bei Empfängertieren, die immunsuppressiv durch ALS und eine Ganzkörperbestrahlung von 600 R vorbereitet waren, beruht möglicherweise nur auf dem Stammzell-zytotoxischen Effekt des ALS, das dem Transplantat kurzzeitig Raum geschaffen hat.

Eine Kombination aus ALS und Ganzkörperbestrahlung ermöglicht, offenbar auf Grund der peripheren Wirkung des ALS und der zentralen der Strahlen bei einer Dosis über 600 R zu einem langdauernden Chimärismus zu gelangen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Antilymphozytenserum als ein insbesondere gegen immunkompetente Zellen gerichtetes Agens die bisher übliche immunsuppressive Vorbehandlung mit ionisierenden Strahlen zu ersetzen vermag.

Zu diesem Zweck wurden letal bzw. subletal bestrahlten Mäusen des Inzuchtstammes C57BL6-CBA-T6-F₁ nach immunsuppressiver Vorbehandlung 50×10^6 Knochenmarkzellen von Mäusen des Inzuchtstammes Balb c in die Schwanzvene injiziert. Die der Transplantation vorausgehende immunsuppressive Behandlung der Empfängertiere bestand aus einer Ganzkörperbestrahlung mit ionisierenden Strahlen, wobei gleichzeitig die erforderliche Knochenmarkaplasie erzeugt wurde.

In den einzelnen Versuchsreihen erhielten die Tiere unterschiedliche Strahlendosen. Jeweils ein Teil der Tiere wurde vor der Ganzkörperbestrahlung mit Antilymphozytenserum behandelt. Dabei wurden verschiedene Konditionierungsschemata angewendet. Die Spenderzellen wurden vor der Transplantation mit Antithetaserum inkubiert.

Die Wirkung der immunsuppressiven Vorbehandlung wurde an der Dauer und Stärke des Chimärismus abgelesen. Dazu wurden Tiere der einzelnen Versuchsreihen zu bestimm-

ten Zeitpunkten getötet und ihr Knochenmark auf Spenderzellen hin untersucht. Dies geschah unter dem Mikroskop, wo die chromosomale Unterschiedlichkeit zwischen Spender- und Empfängerzelle leicht erkannt werden konnte. Die Absicherung sämtlicher Ergebnisse erfolgte statistisch mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes und des T-Testes.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Tiere, die mit 900 oder 800 R immunsuppressiv vorbehandelt worden waren, zeigten einen langdauernden Chimärismus. Die durch ALS-Applikation erzielte Verbesserung konnte statistisch nicht abgesichert werden.
2. Nach Reduktion der Strahlendosis auf 700 R konnten Chimären nur noch bei Tieren gefunden werden, die vor der Bestrahlung zusätzlich ALS erhalten hatten.
3. Das chimäristische Verhalten der mit ALS vorbehandelten und mit 700 R bestrahlten Gruppe zeigte statistisch keinen Unterschied gegenüber dem Verhalten der mit 900 R oder mit 800 R bestrahlten Gruppen.
4. Einen kurzdauernden Chimärismus zeigten Tiere, die eine immunsuppressive Vorbehandlung, bestehend aus einer Ganzkörperbestrahlung von 600 R und einer ALS-Applikation, erhalten hatten.

5. Wurden Tiere nur mit 500 R ganzkörperbestrahlt, so zeigten sie auch bei zusätzlicher ALS-Gabe keinen Chimärismus.
6. Für die immunsuppressive Konditionierung erwies sich das Verfahren von Rössler (27) als besonders geeignet, wonach die Tiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen ALS erhalten und die Ganzkörperbestrahlung nach einer dreitägigen Pause erfolgt.
7. Eine akute oder chronische graft-versus-host-Reaktion konnte bei fast allen Tieren durch eine Inkubation der Spenderzellen mit Antithetaserum vor der Transplantation verhindert werden.

Einige der Literatur entnommene Ergebnisse von Untersuchungen der Immungenetik und die Vorstellungen von der Immunantwort nach dem derzeitigen Stand wurden erörtert, die bisher durchgeführten immunsuppressiven Möglichkeiten zusammengefaßt und die in den Versuchen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

11. Cole, Fishler,
Bond Subcellular Fractionation of Mouse
Spleen Radiation Protection Activity.
Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 759-771, 1953
12. Vos, Davids,
Weyzen, van Bekkum Evidence for the Cellular Hypothesis
in Radiation Protection by Bone Marrow
Cells.
Acta Physiol. Neederlandica 4, 482-486,
1956
13. Ford, Hamerton,
Barnes, Loutit Cytological Identification of Radiation
Chimeras.
Nature 177, 452-454, 1956
14. Russel Implantation of Normal Blood Forming
Tissues in Irradiated Genetically
Anemic Hosts.
Science 124, 1076-1077, 1956
15. Trentin Mortality and Skin Transpatibility in
X-Irradiated Mice Receiving Isologous,
Homologous or Heterologues Bone Marrow.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 688-
693, 1956
16. Trentin Induced Tolerance and "Homologous Disease"
in X-Irradiated Mice Protected with
Homologous Bone Marrow.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96, 139-144, 1957
17. Fefer, Buckner,
Clift, Pass, Lerner, Hematologic Malignices.
Mickelson, Neimann, Transpl. Proc. 5, 927-931, 1973
Rudolph, Storb, Tho-
mas
18. Billingham, Brent, Quantitative Studies of Tissue Trans-
plantation Immunity III. Actively
Medawar Acquired Tolerance.
Phil. Trans. B. 239, 357-415, 1956
19. Van Bekkum Radiation Chimeras.
Logos Press Ltd., Acad. Press London,
40-48, 1967

20. Van Bekkum Radiation Chimeras.
Logos Press Ltd., Acad. Press London
S. 28-32, 1967
21. Brendel, Fichlmayr Heterologe Antilymphozytenseren zur
Immunsuppression bei Organtransplan-
tationen.
Deutsche med. Wschr. 12, 549-558, 1967
22. Brendel, Seifert,
Ring Die klinische Anwendung von Antilym-
phozytenglobulin (ALG).
Münchener med. Wschr. 35, 1361-1368,
1975
23. Bau, Thierfelder Antilymphocytic Antibodies and Marrow
Transplantation I The Effect of Anti-
lymphocytic Serum on Xenogenic Engraft-
ment.
Transplantation 15, 564-567, 1973
24. Gray, Monaco,
Wood, Russel Studies on Heterologous ALS in Mice
I In Vitro and in Vivo Properties.
J Imm. 90, 217-228, 1966
25. Turk Central and Peripheral Effects of
Antilymphocyte Antisera.
Lancet 249-251, 1967
26. Rodt, Thierfelder,
Eulitz Antilymphocytic Antibodies and Marrow
Transplantation IV Comparision of the
Effects of Antibody Fragments Directed
against Immunoglobulin or Lymphocyte
Antigens on Acute Secondary Disease.
Exp. Hemat. 2, 195-203, 1974
27. Rössler, Thierfel-
der, Ruppelt Unterdrückung der Wirt gegen Transplan-
tat Reaktion gemessen im Lymphknoten-
test.
28. Billingham, Silvers The Transplantation of Tissues and Cells
Wistar Institute Press, Philadelphia 149
29. Snell, Stimpfling Genetics of Tissue Transplantation
2nd ed., 457-491, Mc Graw 1966
In: Biology of the laboratory Mouse

30. Cantrell, Hildemann Characteristics of Disparate Histo-
compatibility Barriers in Congenic
Strains of Mice I. Graft versus
Host Reactions.
Transplantation 14, 761-770, 1972
31. Klein, Park Graft versus Host Reaktion across
Different Regions of the H-2 Complex
of the Mouse.
J. Exp. Med. 137, 1213-1225, 1973
32. Billingham, Brent
Medawar Quantitative Studies of Tissue Trans-
plantation Immunity III. Actively
Acquired Tolerance.
Phil. Trans. B.239, 386 - 389, 1966
33. Huhn, Rodt, Thier-
felder Immunhistochemische Untersuchungen an
T-Lymphozyten der Maus.
Blut 28, 415-429, 1974
34. Douglas, McGregor Bone Marrow Origin of Immunologically
Competent Lymphocytes in the Rat.
J. Exp. Med. 127, 953-966, 1968
35. Mitchell, Miller Cell to Cell Interaction in the Immune
Response II The Source of Hemolysin
forming Cells in Irradiated Mice Given
Bone Marrow and Thymus or Thoracic
Duct Lymphocytes.
J. Exp. Med. 128, 821-837, 1968
36. Clamann, Chaperon,
Triplett Immunocompetence of Transferred Thymus
Marrow Cell combinations.
J. Imm. 97, 828-832, 1966
37. Parrot Thymus Dependent Areas in the Lymphoid
Organs of Neonatally Thymectomized
Mice.
J. Exp. Med. 123, 191-204, 1967
38. Osoba, Miller Evidence for a Humoral Thymus Factor
Responsible for the Maturation of
Immunological Faculty.
Nature 199, 653-655, 1963

39. Weissmann Thymus Cell Migration.
J. Exp. Med. 126, 291-304, 1967
40. Denman A Thymic Origin for some Peripheral
Blood Lymphocytes.
The Lancet I, 183- , 1968
41. Miller Immunological Function of the Thymus.
The Lancet I, 748-749, 1961
42. Miller Effect of Thymectomy in Adult Mice on
Immunological Responsiveness.
Nature 208, 1337-1338, 1965
43. Jeejeebhoy Immunological Studies on the Rat
Thymectomized in Adult Life.
Imm. 9, 417-425, 1965
44. Miller Role of the Thymus in Recovery of the
Immune Mechanisme in the Irradiated
Adult Mouse.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 785-
792, 1963
45. Woodruff, Anderson The Effect of Lymphocyte Depletion by
Thoracic Duct Fistula and Administration
of Antilymphocytic Serum on the Survival
of Skin Homografts in Rats.
Nature 200, 702, 1963
46. Fox Suppression of Tissue Immunity by
Cyclophosphamide.
Transplantation 2, 475-486, 1969
47. Aisenberg Studies on Cyclophosphamide Induced
Tolerance to Sheep Erythrocytes.
J. Exp. Med. 125, 833-845, 1967
48. Kuttig, Wieland Kursus: Radiologie und Strahlenschutz.
IV. Strahlentherapie.
Heidelberger Taschenbücher 112, S.187,
1972

49. Ledney Influence of Antilymphocyte Serum on Hemopoietic Proliferation in the Mouse as Measured by Spleen Weight and Colony Forming Unit Assays.
Exp. Hematology 14, 42-43, 1967
50. Van Bekkum,
de Vries Radiation Chimeras.
Logos Press Ltd, Acad. Press London Ltd., 128-131, 1967
51. Gottlieb
Gengozian Radiation Dose, Dose Rate, and Quality in Suppression of the Humoral Immune Response.
J. Imm. 109, 719-727, 1972
52. Metchnikoff Etudes sur la Resorption de Cellules.
Ann. Pasteur 13, 737-764, 1899
53. Besredka La Leucotoxine et son action sur le système leucocytaire.
Ann. Inst. Pasteur, S. 390, 1900
54. Christian, Leen Some further Observations on Leucotoxins.
Boston Med. and Surg. J., 152, 397-398, 1905
55. Pappenheimer Experimental Studies on Lymphocytes II. The Action of Immune Sera upon Lymphocytes and Small Thymus Cells.
J. Exp. Med. 26, 163-179, 1917
56. Flexner The Pathology of Lymphotoxic and Myelotoxic Intoxication.
Univ. of Pennsylvania Med. Bull. xv 287-295, 1902
57. Chew, Lawrence Antilymphocytic Serum.
J. Imm. 33, 271-278, 1937
58. Woodruff, Forman Effects of Antilymphocytic Serum on Suspensions of Lymphocytes in Vitro.
Nature 168, 35-36, 1954

59. Waksman, Arbouys, Arnason The Use of Specific Lymphocyte Antisera to Inhibit Hypersensitive Reactions of the Delayed Type.
J. Exp. Med. 114, 997-1021, 1961
60. Sacks, Filippone, Hume Studies of Immune Destruction of Lymphoid Tissue. I. Lymphocytotoxic Effect of Rabbit-Anti-Rat Lymphocyte Antiserum. Transplantation 2, 60-74, 1964
61. Monaco, Wood, Gray, Russel Studies on Heterologous Anti-Lymphocyte Serum in Mice II. Effect on The Immune Response.
J. Imm. 96, 229-238, 1966
62. Russel, Monaco Heterologous Antilymphocyte Serum
Heterologous Antilymphocyte Sera and Some of their Effects.
Transplantation 5, 1086-1099, 1967
63. Nagaya, Sieker Allograft Survival: Effects of Antisera to Thymus Glands and Lymphocytes.
Science 150, 1181-1182, 1965
64. Pichlmayr Herstellung und Wirkung heterologer Antilymphozytenserum.
Z. f. d. ges. exp. Med. 143, 161-226, 1967
65. Abaza, Nolan, Watt, Woodruff Effect of Antilymphocytic Serum on the Survival of Renal Homotransplants in Dogs.
Transpl. 4, 618-632, 1966
66. Monaco Antiserum to Lymphocytes: Prolonged Survival of Canine Renal Allografts.
Science 153, 1264, 1966
67. Pichlmayr Wirkung eines heterologen Antilymphozytenserums auf die Transplantatabstossung beim Hund.
Klin. Wschr. 44, 594-596, 1966

68. Prinsen Bone Marrow Transplantation of Rhesus Monkeys. ALS Treatment of the Recipient prior to Transplantation. XIII Hämatologie Kongress, Abstract Vol., München 1970, S. 405
69. Levey, Medawar Some Experiments on the Action of Antilymphoid Antisera. Ann. N.Y. Acad. Sci. 129, 164-177, 1966
70. Levey, Medawar Further Experiments on the Action of Antilymphocytic Antiserum. Nat. Acad. Sci. 58, 470-477, 1967
71. Lance The Selective Action of Antilymphocyte Serum on Recirculating Lymphocytes: A Review of the Evidence and the Alternatives. Clin. Exp. Imm. 6, 789-802, 1970
72. Denman, Denman, Embling Changes in the Life Span of Circulating Small Lymphocytes in Mice After Treatment with Anti-Lymphocyte Globulin. Lancet I, 321-325, 1968
73. Denman, Frenkel Mode of Action of Anti-Lymphocyte Globulin II. Changes in the Lymphoid Cell Population in Rats Treated with Anti-Lymphocyte Globulin. Imm. 14, 115-126, 1968
74. Denman, Frenkel Mode of Action of Anti-Lymphocyte Globulin I. The Distribution of Rabbit Anti-Lymphocyte Globulin Injected into Rats and Mice. Imm. 14, 107-113, 1968
75. Taub, Lance Effects of Heterologous Anti-Lymphocyte Serum on the Distribution of ^{51}Cr -Labelled Lymph Node Cells in Mice. Imm. 15, 633-642, 1968

84. Cantor, Mandel, Asofsky Studies of Thoracic Duct Lymphocytes II. A Qualitative Comparision of the Capacity of Thoracic Duct Lymphocytes and Other Lymphoid Cells to Induce Graft-versus-Host Reactions.
J. Imm. 104, 409-413, 1970
85. Mathé Bone Marrow Transplantation Human Transplantation ed. F.T. Rappaport and J. Dausset, 284-303, 1968
86. Van Bekkum The Selective Elimination of Immunologically Competent Cells From Bone Marrow and Lymphatic Cell Mixtures.
I. Effect of Storage at 4° C.
Transplantation 2, 393-404, 1964
87. Ledney, van Bekkum Secondary Disease in Irradiated Mice Grafted with Allogeneic Bone Marrow from Antilymphocyte treated Donors.
J. Nat. Canc. Inst. 42, 633-641, 1969
88. Ledney, van Bekkum Suppression of Acute Secondary Disease in the Mouse with Antilymphocyte Serum.
Adv. in Transpl., Munksgaard, Kopenhagen, S. 441-448, 1967
89. Thierfelder, Möller, Kimura, Dörmer, Eulitz, Mempel Die Wirkung von heterologem Antilymphozytenserum auf die homologe und heterologe Knochenmarksübertragung bei Mäusen.
Blut XV, 225-229, 1967
90. Rodt, Thierfelder, Eulitz Antilymphatic Antibodies and Marrow Transplantation III. Effect of Heterologous Anti-Brain Antibodies on Acute Secondary Disease in Mice.
Eur. J. Imm. 4, No. 1, 26-29, 1974
91. Monaco Adult Thymectomy: Effect on Recovery from Immunologic Depression in Mice.
Science 149, 432-435, 1965

Herrn Professor Dr. S. Thierfelder danke ich für die Überlassung des Themas und für den Arbeitsplatz, allen Mitarbeitern der Abteilung für Immunhämatologie für ihre Unterstützung und ihre Ratschläge.

Lebenslauf

16.8.1950	geboren als Sohn von Dr. Dr. Karl Aders und seiner Gemahlin Herta Aders, geb. Stoll, in München
1956-60	Volksschule in München
1960-69	Albert-Einstein-Gymnasium in München
28.6.1969	Reifeprüfung
1969-71	Studium der Chemie an der Universität München
1971-76	Studium der Medizin an der Universität München
6.4.1973	Ärztliche Vorprüfung
1.9.1976	Staatsexamen

